

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報(A)

平5-509098

⑬ 公表 平成5年(1993)12月16日

⑭ Int. Cl.⁹ 識別記号 庁内整理番号 審査請求 未請求
 A 61 K 37/24 ADD 8314-4C 予備審査請求 有 部門(区分) 3(2)
 C 07 K 7/10 ZNA 7537-4H
 C 07 K 99:00

(全 29 頁)

⑯ 発明の名称 3, 6 または 9 位において変性されている副甲状腺ホルモン類似体

⑰ 特 願 平3-513078

⑱ 翻訳文提出日 平5(1993)1月13日

⑲ 出 願 平3(1991)7月15日

⑳ 国際出願 PCT/US91/04971

㉑ 国際公開番号 WO92/00753

㉒ 国際公開日 平4(1992)1月23日

優先権主張 ㉓ 1990年7月13日 ㉔ 米国(US) ㉕ 553,760

⑰ 発 明 者 コウエン フレッド エイ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94107 サンフランシスコ
ロード アイランド ストリート 767⑱ 出 願 人 ザ リージエンツ オブ ザ アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94612-3550 オークランド
ユニバーシティー オブ カリ レイクサイド ドライブ 300 トウエンティーセカンド フロ
フォルニア アー

㉖ 代 理 人 弁理士 杉村 曉秀 外1名

㉗ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域
特許), FR(広域特許), GB(広域特許), GR(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL
L(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に続く

請 求 の 範 囲

1. 次式:

H₂N - (Ser または Ala)¹ - Val - B² - Glu - Ile - J³ -
 (Leu または Phe)⁴ - Met - X⁵ - Asn⁶ - Leu - Gly - Lys
 - His - Leu - (Asn または Ser)⁷ - Ser - (Met または
 Leu)⁸ - Glu - Arg⁹ - Val - Glu - Trp - Leu - Arg -
 Lys - Lys - Leu - Gln - Asp¹⁰ - Val - His - Asn -
 Phe¹¹ - Z (構造式 I)

(上式において

3 位のアミノ酸 B は、L-セリン、または B がグリシンを
 示さない場合にはセリンと同等であるかセリンより大きい空
 間容積を有する他の天然または合成の D-もしくは L-アミ
 ノ酸から独立に選択されたものを示し、

6 位のアミノ酸 J は、L-グルタミンまたは他の天然もし
 くは合成の D-アミノ酸、L-アミノ酸あるいは D-アミノ
 酸と L-アミノ酸との混合物から独立に選択されたものを
 示し、

9 位のアミノ酸 X は、L-ヒスチジンまたは他の天然もし
 くは合成の D-あるいは L-アミノ酸から独立に選択され
 たものを示し、ただし原子団 B が L-セリンを示しかつ原子
 団 J が L-グルタミンを示す場合には、原子団 X は L-ヒス
 チジンを示さず、また原子団 B が L-セリンを示しかつ原子
 団 X が L-ヒスチジンを示す場合には、原子団 J は L-グル
 タミンを示さず、また原子団 J が L-グルタミンを示しかつ
 原子団 X がヒスチジンを示す場合には、原子団 B は L-セリ
 ンを示さず、

Z は、-COOH、-COO-M (式中の M は医薬
 として受け入れることのできる陽イオンから選択されたもの
 を示す)、-(C=O)NH₂、またはヒト、ウシまたはブタ
 の副甲状腺ホルモン(35~84)またはヒト、ウシまたは
 ブタの副甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrP)(35
 ~141)のアミノ酸配列から独立に選択されたものを示
 す)で表わされる化合物、またはその医薬として受け入れる
 ことのできる塩を含有することを特徴とする医薬組成物。

2. 1 位のアミノ酸がセリンであり、7 位のアミノ酸がロイシ
 ンであり、18 位のアミノ酸が Asn であり、18 位のアミ
 ノ酸がメチオニンであり、Z はヒト PTH(35~84)の
 アミノ酸連鎖を示すことを特徴とする請求の範囲第 1 項記載
 の医薬組成物。

3. 1 位のアミノ酸はアラニンであり、7 位のアミノ酸はフェ
 ニルアラニンであり、18 位のアミノ酸はセリンであり、
 18 位のアミノ酸はメチオニンであり、Z はウシ PTH(35
 ~84)のアミノ酸連鎖を示すことを特徴とする請求の範囲
 第 1 項記載の医薬組成物。

4. 構造式 I において、1 位のアミノ酸はセリンであり、7 位
 のアミノ酸はロイシンであり、18 位のアミノ酸はセリンで
 あり、18 位のアミノ酸はロイシンであり、Z は、ブタ PTH
 (35~84)のアミノ酸連鎖を示すことを特徴とする請
 求の範囲第 1 項記載の医薬組成物。

5. Zは-COOHまたは-COO-M、または-(C=O)NH₂を示すことを特徴とする請求の範囲第1項記載の医薬組成物。

6. 1位のアミノ酸はセリンであり、7位のアミノ酸はロイシンであり、16位のアミノ酸はAsnであり、18位のアミノ酸はメチオニンであり、Zは-COOHまたは-COO-Mまたは-(C=O)NH₂を示すことを特徴とする請求の範囲第5項記載の医薬組成物。

7. 1位のアミノ酸はアラニンであり、7位のアミノ酸はフェニルアラニンであり、16位のアミノ酸はセリンであり、18位のアミノ酸はロイシンであり、Zは-COOH-Mまたは-(C=O)NH₂を示すことを特徴とする請求の範囲第5項記載の医薬組成物。

8. 構造式1において、1位のアミノ酸はセリンであり、7位のアミノ酸はロイシンであり、16位のアミノ酸はセリンであり、18位のアミノ酸はロイシンであり、Zは-COOHまたは-COO-Mまたは-(C=O)NH₂を示すことを特徴とする請求の範囲第5項記載の医薬組成物。

9. BはL-セリンを示すことを特徴とする請求の範囲第5項記載の医薬組成物。

10. JはLeu, Phe, Ala, Glu, Ser、またはPheから独立に選択されたものを示すことを特徴とする請求の範囲第8項記

載の医薬組成物。

11. JはL-グルタミンを示すことを特徴とする請求の範囲第5項記載の医薬組成物。

12. BはAla, Phe, Gln, Glu, Lys, His、またはTyrから独立に選択されたものを示すことを特徴とする請求の範囲第11項記載の医薬組成物。

13. BはL-セリン、Ala, Phe, Gln, Glu, Lys, HisまたはTyrから独立に選択されたものを示すことを特徴とする請求の範囲第5項記載の医薬組成物。

14. BはL-グルタミン、Leu, Phe, Ala, Glu, Ser、またはPheから独立に選択されたものを示すことを特徴とする請求の範囲第5項記載の医薬組成物。

15. H₂N-Ser-Val-Lys-A' ;
H₂N-Ser-Val-Phe-A' ;
H₂N-Ser-Val-Leu-A' ;
H₂N-Ser-Val-Ala-A' ;
H₂N-Ser-Val-Thr-A' ;
H₂N-Ser-Val-Cys-A' ;
H₂N-Ser-Val-Tyr-A' ;
H₂N-Ser-Val-Asp-A' ;
H₂N-Ser-Val-Glu-A' ;
H₂N-Ser-Val-Asn-A' ;

H₂N-Ser-Val-Gln-A' ;
H₂N-Ser-Val-Lys-A' ;
H₂N-Ser-Val-Arg-A' ;
H₂N-Ser-Val-His-A' ;
H₂N-Ser-Val-Val-A' ;
H₂N-Ser-Val-Ile-A' ;
H₂N-Ser-Val-Trp-A' ;
H₂N-Ser-Val-Met-A' ;
H₂N-Ser-Val-Pro-A' ;
H₂N-Ser-Val-Nle-A' ;
H₂N-Ser-Val-D-Nal-A' ;
H₂N-Ser-Val-Orn-A' ;

H₂N-Ala-Val-Ala-A' ;
H₂N-Ala-Val-Thr-A' ;
H₂N-Ala-Val-Cys-A' ;
H₂N-Ala-Val-Tyr-A' ;
H₂N-Ala-Val-Asp-A' ;
H₂N-Ala-Val-Glu-A' ;
H₂N-Ala-Val-Asn-A' ;
H₂N-Ala-Val-Gln-A' ;
H₂N-Ala-Val-Lys-A' ;
H₂N-Ala-Val-Arg-A' ;
H₂N-Ala-Val-His-A' ;
H₂N-Ala-Val-Val-A' ;
H₂N-Ala-Val-Leu-A' ;
H₂N-Ala-Val-Ile-A' ;

H₂N-Ala-Val-Pro-A' ;
H₂N-Ala-Val-Phe-A' ;
H₂N-Ala-Val-Trp-A' ;
H₂N-Ala-Val-Met-A' ;
H₂N-Ala-Val-Nle-A' ;
H₂N-Ala-Val-D-Nal-A' ;
H₂N-Ala-Val-Orn-A' ;

(ただし、A'はヒトPTH、またはウシPTHまたはブタPTHもしくはそれらのZ=-COOHまたは-COO-Mまたは-(C=O)NH₂誘導体の7~84アミノ酸配列あるいはhPTH、bPTH、またはpPTHまたはhPTH rPの7~84配列から選択されたものを示す)。

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Ala-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Thr-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Cys-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Tyr-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Asp-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Glu-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Asn-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Ser-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Lys-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Arg-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-His-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Val-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Leu-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Ile-B' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Pro-B' ;

特表平5-509098 (3)

H₂N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Phe - B' ;
H₂N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Trp - B' ;
H₂N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Met - B' ;
H₂N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gly - B' ;
H₂N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Nle - B' ;
H₂N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - D-Nal - B' ;
H₂N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Orn - B' ;

H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Ala - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Thr - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Cys - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Tyr - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Asp - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Glu - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Asn - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Ser - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Lys - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Arg - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - His - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Val - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Leu - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Ile - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Pro - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Phe - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Trp - B' ;
H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Met - B' ;

H₂N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Gly - B' ;
H₂N - Ser - Val - Phe - Glu - Ile - Phe - B' ;
H₂N - Ser - Val - Dhe - Glu - Ile - Nle - B' ;
H₂N - Ser - Val - Phe - Glu - Ile - D-Nal - B' ;
H₂N - Ser - Val - Phe - Glu - Ile - Orn - B' ;
H₂N - Ser - Val - Phe - Glu - Ile - Ser - B' ;
H₂N - Ser - Val - Tyr - Glu - Ile - Phe - B' ;
H₂N - Ser - Val - Tyr - Glu - Ile - Ser - B' ;
H₂N - Ser - Val - Phe - Glu - Ile - Ala - B' ;
H₂N - Ser - Val - His - Glu - Ile - Ala - B' ;
H₂N - Ser - Val - Leu - Glu - Ile - Ala - B' ;
H₂N - Ser - Val - Lys - Glu - Ile - Ala - B' ;
H₂N - Ser - Val - His - Glu - Ile - Glu - B' ;
H₂N - Ser - Val - Leu - Glu - Ile - Glu - B' ;
H₂N - Ser - Val - Lys - Glu - Ile - Glu - B' ;

H₂N - Ala - Val - Phe - Glu - Ile - Phe - B' ;
H₂N - Ala - Val - Phe - Glu - Ile - Ser - B' ;
H₂N - Ala - Val - Val - Glu - Ile - Phe - B' ;
H₂N - Ala - Val - Tyr - Glu - Ile - Phe - B' ;
H₂N - Ala - Val - Tyr - Glu - Ile - Ser - B' ;
H₂N - Ala - Val - Phe - Glu - Ile - Ala - B' ;
H₂N - Ala - Val - Lys - Glu - Ile - Ala - B' ;
H₂N - Ala - Val - His - Glu - Ile - Ala - B' ;
H₂N - Ser - Val - His - Glu - Ile - Ala - B' ; または
H₂N - Ser - Val - Leu - Glu - Ile - Ala - B' ;

(ただし、原子団B' はhPTH、またはbPTH、または

pPTHもしくはこれらのZ=COOHまたはCOO⁻+Mまたは-(C=O)NH₂誘導体の7~34活性単位の残りのペプチドの残留物あるいはhPTHまたはbPTHまたはhPTHrPの7~84配列から選択されたものを示す)。

H₂N-Ser-Val-Phe-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-D' ;
H₂N-Ser-Val-Phe-Glu-Ile-Ser-Leu-Met-His-D' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Phe-Leu-Met-His-D' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Ser-Leu-Met-His-D' ;
H₂N-Ser-Val-Tyr-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-D' ;
H₂N-Ser-Val-Tyr-Glu-Ile-Ser-Leu-Met-His-D' ;
H₂N-Ser-Val-Tyr-Glu-Ile-Phe-Leu-Met-His-D' ;
H₂N-Ser-Val-Phe-Glu-Ile-Phe-Leu-Met-His-D' ;
H₂N-Ser-Val-Tyr-Glu-Ile-Nle-Leu-Met-His-D' ;
H₂N-Ser-Val-Phe-Glu-Ile-D-Nal-Leu-Met-His-D' ;
H₂N-Ser-Val-Phe-Glu-Ile-Orn-Leu-Met-His-D' ;

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Ala-D' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Ser-D' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Leu-D' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Phe-D' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Tyr-D' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Glu-D' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Lys-D' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Gln-D' ; または
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Nle-D' ;
H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-D-Nal-D' ;

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Ala-D' ;
H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Ser-D' ;
H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Leu-D' ;

$\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{Phe}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{Tyr}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{Glu}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{Lys}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{Gln}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{Nle}-\text{D}'$; または
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{D}-\text{Nal}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{Orn}-\text{D}'$;

$\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Phe}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{His}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Phe}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Ser}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{His}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{His}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Ser}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Ser}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{His}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Tyr}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Gln}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{His}-\text{D}'$;

18. 1位および3位のアミノ酸はL-セリンであり、A'、B'およびD'はZ- $-\text{COOH}$ または $-\text{COO}-\text{M}$ または $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$ で終端するhPTH(1~34)を示すことを特徴とする請求の範囲第15項記載の医薬組成物。

19. 1位のアミノ酸はL-アラニンであり、Bはセリンを示し、A'、B'およびD'はZ- $-\text{COOH}$ または $-\text{COO}-\text{M}$ または $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$ で終端するbPTH(4~34)を示すことを特徴とする請求の範囲第15項記載の医薬組成物。

20. 1位のアミノ酸はL-セリンであり、3位のアミノ酸はL-セリンでなく、A'、B'およびD'はZ- $-\text{COOH}$ または $-\text{COO}-\text{M}$ または $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$ で終端するhPTH(1~34)を示すことを特徴とする請求の範囲第15項記載の医薬組成物。

21. 1位のアミノ酸はL-アラニンであり、3位のアミノ酸はL-セリンでなく、A'、B'およびD'はZ- $-\text{COOH}$ または $-\text{COO}-\text{M}$ または $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$ で終端するbPTH(1~34)を示すことを特徴とする請求の範囲第15項記載の医薬組成物。

22. 1位のアミノ酸はセリンであり、3位のアミノ酸はセリンであり、6位のアミノ酸はL-グルタミンでなく、A'、B'およびD'はZ- $-\text{COOH}$ または $-\text{COO}-\text{M}$ または $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$ で終端するhPTH(1~34)であるこ

$\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Tyr}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Ser}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{His}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Phe}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{His}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Tyr}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{His}-\text{D}'$;
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{Nle}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{His}-\text{D}'$; または
 $\text{H}_2\text{N}-\text{Ala}-\text{Val}-\text{D}-\text{Nal}-\text{Glu}-\text{Ile}-\text{Phe}-\text{Phe}-\text{Met}-\text{Phe}-\text{D}'$

(ただし、D'はヒトまたはウシまたはブタのPTHもしくはこれらのZ- $-\text{COOH}$ または $-\text{COO}-\text{M}$ または $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$ 誘導体の10~34アミノ酸配列、あるいはhPTH、bPTH、pPTHまたはhPTHrPの残りの10~84配列から選択されたものを示す)から独立に選択されたポリペプチド、またはその医薬として受け入れることのできる塩と、医薬として受け入れることのできる賦形剤とを組み合わせたことを特徴とする医薬組成物。

16. A'、B'およびD'が $-\text{COOH}$ で終端するhPTH(1~34)を示すことを特徴とする請求の範囲第15項記載の医薬組成物。

17. A'、B'およびD'は $-\text{COO}-\text{M}$ (式中のMはナトリウム、カリウム、カルシウムまたはバリウムから選択されたものを示す)で終端するhPTH(1~34)を示すことを特徴とする請求の範囲第15項記載の医薬組成物。

とを特徴とする請求の範囲第15項記載の医薬組成物。

23. 1位および3位のアミノ酸はL-セリンであり、6位のアミノ酸はL-グルタミンであり、9位のアミノ酸はL-ヒスチジンでなく、原子団D'はZ- $-\text{COOH}$ または $-\text{COO}-\text{M}$ または $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$ で終端するhPTH(10~34)を示すことを特徴とする請求の範囲第15項記載の医薬組成物。

24. Zが $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$ を示すことを特徴とする請求の範囲第1項記載の医薬組成物。

25. Zが $-(\text{C}=\text{O})\text{NH}_2$ を示すことを特徴とする請求の範囲第15項記載の医薬組成物。

26. 請求の範囲第1項記載の化合物またはその医薬として受け入れることのできる塩と、薬理的に受け入れることのできる賦形剤とを組み合わせたことを特徴とする医薬組成物。

27. 治療処置を必要とする哺乳動物を治療処置するに当たり、治療に有効な量の請求の範囲第1項記載の化合物またはその医薬として受け入れることができる塩を、医薬として受け入れることのできる賦形剤と組み合わせることを特徴とする治療処置方法。

28. 治療に有効な量の構造式Iで表わされる化合物を、経口、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、眼、直腸、頬、舌下または

巢内手段によって投与することを特徴とする請求の範囲第27項記載の方法。

29. 前記化合物を使用して、ヒトにおけるガン、粗鬆症、高カルシウム血症または副甲状腺機能亢進症の病状状態を治療処置することを中心とする請求の範囲第28項記載の方法。
30. 医薬組成物において有用なPTHまたはPTH(1~34)の3, 6, 9位またはこれらの組み合わせにおいて変性されているポリペプチド配列を選択するに当たり、
- (a) 3, 6, 9位またはこれらの組み合わせにおけるアミノ酸が異なるD-もしくはL-天然アミノ酸または非天然アミノ酸により置換されているhPTH, bPTH, pPTH, hPTHrP, bPTHrP, hPTH(1~34), bPTH(1~34)またはpPTH(1~34)のアミノ酸配列を作り;
- (b) 特定の柔組織、膜または細胞を用いてアッセイを行って受容体結合性および活性を評価し;
- (c) 特定の骨細胞を用いてアッセイを行って受容体結合性および活性を評価し;
- (d) (i) 特定の柔組織、膜または細胞において高い結合性(B)および高い活性(AC)を有し、かつ高い特定の骨細胞結合性(B)および高い活性(AC)を有するペプチドアミノ酸類似体を、病状状態の柔組織、膜、細胞または骨を医学的治療処置するためのアゴニストとしてさらに評価するために、独立的に選択し;あるいはまた
- (ii) 高い結合性(B)および高い活性(AC)を有す

合性(B)および活性(AC)は基準ペプチドの約50%またはそれ以上であり、低い特定の骨細胞結合性(B)は約5%またはそれ以下であり、骨細胞の低い活性は約10%またはそれ以下であることを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。

33. 工程(d)(iii)において、特定の柔組織における低い結合性(B)は基準ペプチドの10%未満であり、低い活性(AC)は約5%またはそれ以下であり、骨の病状状態に対する高い特定の骨細胞結合性(B)および高い活性(AC)は基準ペプチドの50%またはそれ以上であることを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。
34. 工程(d)(iv)において、ホルモン異常およびガンを医学的治療処置する際のアンタゴニストとして使用するために、組織、膜または細胞および骨細胞における高い結合性(B)は50%より大きく、低い活性(AC*)は約5%またはそれ以下であることを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。
35. 柔組織、膜または細胞が腎臓から得られたものであることを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。

るペプチドアミノ酸類似体を、一定の柔組織、膜または細胞における医学的治療処置のためのアゴニストとして、また低い特定の骨細胞結合性(B)および低い活性(AC)を有するペプチドアミノ酸類似体を、病状状態の柔組織、膜または細胞に対するアゴニストとしてさらに評価するために、独立的に選択し;あるいはまた

(iii) 特定の組織、膜および細胞において低い結合性(B)を有し、かつ病状状態の骨に対して高い特定の骨細胞結合性(B)および高い活性(AC)を有するペプチドを、アゴニストとして独立的に選択し;あるいはまた

(iv) 組織、膜または細胞および骨細胞における高い結合性(B)および低い活性(AC*)を、ホルモン異常およびガンを医学的治療処置する際のアンタゴニストとして使用するために独立的に選択し;

(e) アミノ酸類似体について次の種々のアッセイまたは毒性試験を行って有用な医薬の確立を行うことを特徴とする

変性ポリペプチド配列の選択方法。

31. 工程(d)(i)において、特定の柔組織、膜または細胞における高い結合性および高い活性(AC)、および高い特定の骨細胞結合性(B)および高い活性(AC)は、基準ペプチドの約50%またはそれ以上であることを特徴とする請求の範囲第30項記載の方法。

32. 工程(d)(ii)において、特定の柔組織、膜または細胞における医学的治療処置のためのアゴニストとしての高い結

明 細 書

3, 6または9位において変性されている副甲状腺ホルモン類似体

発明の背景

関連出願

本出願は1990年7月13日出願された出願番号553, 760号の一部継続出願であり、これをここに参照して加入する。

本発明の起源

ここに開示されている調査は、米国国立予防衛生研究所(U. S. National Institutes of Health)、許可番号GM39900、CA34738およびAM35323並びに復興軍人庁の調査局(Research Service of the Veterans Administration)により部分的に支持されている。米国政府は本発明にある権利を有する。

発明の分野

本発明は、副甲状腺ホルモン(PTH)、副甲状腺ホルモン様タンパク質(PLP)または副甲状腺関連タンパク質(PTHrP)に対してアゴニスト特性またはアンタゴニスト特性を有するポリペプチド類似体に関するものである。3位のセリンアミノ酸、6位のグルタミンアミノ酸または8位のヒスチジンアミノ酸あるいはこれらの組合せは、他の天然または合成のアミノ酸により置換される。好ましくは、約34個のアミノ酸のヒトPTHフラグメントが、有用な薬理学的活性にとって十分である。これらのポリペプチドは、ガン、骨粗鬆症、高カルシ

ウム血症または副甲状腺機能亢進症の病状状態にあるヒトの治療に有用である。

関連技術の説明

有効なPTHアゴニストおよび/またはアンタゴニストに関する調査が徹底的に行われてきた。有効な特定のアンタゴニストの入手可能性は、PTHの作用並びに生理学的および/または病理学的役割の機構に関する研究に有力な調査手段を提供する。若干の調査努力の結果インビトロPTHアンタゴニストに到達した。しかし、これらのポリペプチドのインビボ評価中に、これらのポリペプチドは明確なアンタゴニスト特性を全く示さないことが多かった。

多くのポリペプチドホルモンにおいて、不連続で局所的な構造上の変性が、受容体アゴニストを競合的受容体アンタゴニストに転化させるのに十分である。この観察に基づいて、ホルモンの受容体結合性と生物学的作用と開始という別個の作用が、ポリペプチドホルモン配列内の別個の構造領域によって示されるという考えに達する。副甲状腺ホルモン(PTH)は、このようなポリペプチドホルモンの十分に研究された例である。PTH(1~34)は、イヌ腎臓膜におけるアデニル酸シクラーゼの活性化に関する天然の84アミノ酸ホルモンの完全アゴニストである(下記の参考文献1参照。用いられている文字はアミノ酸配列を記載するのに従来用いられている文字である)。アミノ末端切断によって、PTHで刺激されたアデニル酸シクラーゼの競合的アンタゴニストであるポリペプチドが生成する。従って、(Tyr⁸⁴)bPTH(7~34)アミドは肝臓PTH受容体に対する適度の親和性を保持しているが、アゴニスト活性を全く示さない。特別な弱い受容体結合活性がPTH(25

~34)程度に小さいフラグメントにおいて保持される(参考文献2)。他方、PTH(1~34)のカルボン末端切断によって、漸次低下する親和性を有するアゴニストが生成する。PTH(1~25)は本質的に不活性であると報告されている(参考文献3~5)。PTHの「受容体結合性領域」はアミノ酸残基25~34を含み、「活性化領域」はアミノ酸残基1~6を含むと考えられる。

最近確認された腫瘍誘導タンパク質はPTHとの制限された配列同一性を有し(参考文献6~8)、PTHの能力に匹敵する能力を有するPTH応答性アデニル酸シクラーゼを活性化する(参考文献9~11)。この139~141アミノ酸PTH関連タンパク質(PTHrP)、およびこれから誘導された合成アミノ末端フラグメントは、腎臓および骨格のPTH受容体に対して高い親和性を示す(参考文献12~15)。また、これらはインビボおよびインビトロにおいてPTHの主要な生物学的作用を再現する(参考文献12, 15~18)。PTH関連タンパク質は種々のヒトおよび動物の腫瘍に見出され、証拠文献はこのタンパク質が腫瘍を伴うことの多い高カルシウム血症において病原性の役割を演じることを示唆している(参考文献19, 20)。哺乳類のPTHとPTHrPとの間におけるアミノ酸配列の類似性は、主として1~13のアミノ末端残基に限られ、この中8個が同一である(図1参照)。PTHrPはPTH受容体に対して高い親和性を示すが、PTHの25~34の受容体結合性領域における10個のアミノ酸のうち1個のみがPTHrPと共通である。さらに、PTHrP(14~38)のポリペプチド類似体がROS17/2.8ラット骨肉腫細胞中のPTH受容体に結合する(低い親和性で)ことが報

告されている(参考文献21)。従って、配列の厳密な保存よりむしろコンホメーションの類似性が、PTHおよびPTHrPと共通の受容体との相互作用の基礎になっていることがある。

T. Gardella 等「(1989年9月12日)、Bone and Mineral Research, T. suppl., アブストラクト(abstract) 842」は、ヒト副甲状腺ホルモン1~84の突然変異解析に関して簡潔に報告している。最初の4個のうちの任意のアミノ酸の突然変異がPTHの活性を低下させたと報告されている。

T. Gardella 等「(1990年6月23日)、Program of the 72nd Annual Meeting of the Endocrine Society, アブストラクト(abstract)1071」は、新規なPTH1~84類似体の構造を簡単に報告している。2位および4位のアミノ酸の変性が「アブストラクト」に記載されている。

この技術分野における興味あるいくつかの追加の参考文献としては以下のものがある：

1. A.P. Teitelbaum 等「(1982) Endocrinol., Vol. 111, 1524-1533」。
2. M. Rosenblatt 等「(1980) Endocrinol., Vol. 107, 545-550」。
3. G.V. Segre 等「(1979) J. Biol. Chem., Vol. 254, 6980-6986」。
4. M. Rosenblatt「(1982) Endocrinology of Calcium Metabolism, Parsons, J.A. 編, (Raven Press, ニューヨーク) pp. 103-142」中。
5. G.W. Tregear 等「(1973) Endocrinol., Vol. 93, 1349-1353」。

6. L.J. Suva 等「(1987) Science, Vol. 237, 893-898」。
7. M. Mangin 等「(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 597-601」。
8. M.A. Thiede 等「(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 4605-4608」。
9. W.J. Burtis 等「(1987) J. Biol. Chem., Vol. 262, 7151-7156」。
10. J.M. Moseley 等「(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 5048-5052」。
11. G.J. Stewler 等「(1987) J. Clin. Invest., Vol. 80, 1803-1807」。
12. N. Horiuchi 等「(1987) Science, Vol. 238, 1566-1568」。
13. H. Juppner 等「(1988) J. Biol. Chem., Vol. 263, 8557-8560」。
14. R.A. Nissenson 等「(1988) J. Biol. Chem., Vol. 263, 1566-1568」。
15. B.E. Kemp「(1987) Science, Vol. 238, 1568-1570」。
16. A.P. Stewart 等「(1988) J. Clin. Invest., Vol. 81, 596-600」。
17. A.J.P. Yates 等「(1988) J. Clin. Invest., Vol. 81, 932-938」。
18. D.D. Thompson 等「(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85, 5673-5677」。
19. A.A. Budayr 等「(1989) Ann. Int. Med., Vol. 111, 807-812」。
20. J.E. Henderson 等「(1990) J. Bone Miner. Res., Vol. 5, 105-113」。

21. A.B. Abou-Samra 等「(1989) Endocrinol., Vol. 125, 2215-2217」。
 22. P.Y. Chou等「(1974) Biochemistry, Vol. 12, 211-245」。
 23. J.B. Garnier等「(1978) J. Mol. Biol., Vol. 120, 97-120」。
 24. E.T. Kaiser 等「(1984) Science, Vol. 223, 249-255」。
 25. M. Schiffer 等「(1967) Biophys. J., Vol. 7, 121-135」。
 26. A.M. Piskin 等「(1977) J. Biol. Chem., Vol. 252, 8281-8268」。
 27. J.E. Zull 等「(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 77, 3791-3795」。
 28. J.A. Barden 等「(1989) Eur. J. Biochem., Vol. 184, 379-394」。
 29. J.W. Taylor 等「(1987) Methods In Enzymology, Wu. R. および Grossman, L. 編 (Academic Press, Inc., 米国カリフォルニア州サンディエゴ), Vol. 154, pp. 473-498」中。
 30. J.M. Stewart等「(1972) Progress in Peptide Research, Lande, S. 編 (Gordon and Breach, Inc., 米国ニューヨーク州ニューヨーク), pp. 58-64」中。
 31. R.J. Cotter「(1988) Anal. Chem., Vol. 60, 781A」。
 32. R.A. Nissenson等「(1985) Methods in Enzymology, Birnbaumer, L. および O'Malley, B.W. 編 (Academic Press, Inc., 米国フロリダ州オーランド), Vol. 109, pp. 48-56」中。
 33. A.P. Teitelbaum 等「(1982) Endocrinol., Vol. 111, 1524-1533」。
 34. R.A. Nissenson「(1983) Assay of Calcium-regulating Hormones, Bikle, D.D. 編 (Springer-Verlag, 米国ニューヨーク州ニューヨーク), 247-259」中。
 35. S.D.H. Chan 等「(1990) Molec. Endocrinol., Vol. 4, pp. 838-346」。
 36. Y. Salomon等「(1974) Anal. Biochem. Vol. 58, 541-548」。
 37. J.E. Zull「(1990) J. Biol. Chem., Vol. 265, 5671-5676」。
 38. G.V. Shah 等「(1987) Mol Cell Endocrinol., Vol. 49, 203-210」。
 39. B.S. Hong 等「(1988) Pept es, Vol. 7, 1131-1135」。
 40. T.J. Richmond 等「(1978) J. Mol. Biol., Vol. 119, 537-555」。
 41. P.E. Cohen等「(1979) J. Mol. Biol., Vol. 132, 275-288」。
 42. R.M. Epand等「(1985) Int. J. Peptide Protein Res., Vol. 25, 594-600」。
 43. W.G.J. Hol等「(1978) Nature, Vol. 273, 443-446」。
 44. C. Chothia等「(1977) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 74, 4130-4134」。
 45. S.R. Presnell 等「(1989) Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 86, 6592-6596」。
 46. I. Glover 等「(1983) Biopolymers, Vol. 22, 293-304」。
 47. S.C. Lee等「(1989) Biopolymers, Vol. 28, 1115-1127」。
 48. J.M. Coddington 等「(1989) Molec. Endocrinol., Vol. 3, 749-753」。
 49. A.L. Prelinger, III 等「(1984) J. Biol. Chem., Vol. 259, 5507-5513」。
 50. R.A. Nissenson等「(1979) J. Biol. Chem., Vol. 254, 1469-1475」。
 51. M. Rosenblatt 等「(1976) J. Biol. Chem., Vol. 251, 159-164」。
 52. M. Rosenblatt 等「(1977) Endocrin. Res. Commun., Vol. 4, 115-133」。
 53. M.W. Draper 等「(1982) J. Biol. Chem., Vol. 257, 3714-3718」。
 54. J.A. Parsons等「(1975) Calcium-regulating Hormones: Proceedings of the Fifth Parathyroid Conference, Talmage, R.V., Owen, M. および Parsons, J.A. 編 (Excerpta Medica, オランダ国アムステルダム), pp. 34-39」中。
 55. J.E. Zull 等「(1987) Mol. Cell. Endocrinol., Vol. 51, 267-271」。
 56. C.D. Strader等「(1987) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 4384-4388」。
 57. F.M. Richards「(1974) J. Mol. Biol. Vol. 82, 1-14」。
 58. L. Corporale「(1988) Peptides: Structure and Function, Proceedings of the Ninth American Peptide Symposium, Deber, C.M., Bruby, V.J. および Kopple, K.D. 編 pp. 663-666」中。
 59. H.B. Brewer 等「米国特許第3,888,132号明細書」。
 60. M. Rosenblatt 等「米国特許第4,771,124号明細書」。
 61. G.E. Schulz 等「Principles of Protein Structure, Springer Verlag, 米国ニューヨーク州ニューヨーク ISBN 0387-903348 (1979)」。
 62. H.T. Keutmann 等 (1985),「Endocrinology, Vol. 117(3), p. 1230」。
- 本明細書のどの箇所で引用した参考文献、報文、特許、標準等でもすべてこれらの全体をここに参照として加入する。
- 明細書における括弧内の参照数字は、該当分野において見出される参考文献の番号である。
- 現時点において多くのPTH類似体および研究が、ポリペプチド鎖の主として10〜34領域のアミノ酸の置換に関して報告されている。しかし、アミノ酸が1〜8位のアミノ酸において置換されているhPTHまたはbPTH等の類似体はほとんど報告されていない。本発明は、3位および/または6位および/または8位のアミノ酸が、天然アミノ酸または合成法で製造した不自然な(普通ではない)アミノ酸を用いて置換されている新規なhPTHまたはbPTH等の類似体を選択する方法および製造する方法を提供する。3, 6または8位において置換されているこれらの類似体は、受容体結合性および活性を戻すのに有用な表面側鎖を有する。これらの類似体は、多くの病状状態、特に骨粗鬆症の治療処置におけるアゴニストまたはアンタゴニストとして有用である。
- 発明の要約
- 一つの面において、本発明は、次式:
- $$\text{H}_2\text{N} - (\text{Ser または Ala})^1 - \text{Val} - \text{B}^2 - \text{Glu} - \text{Ile} - \text{J}^3 - (\text{Leu または Phe})^4 - \text{Met} - \text{X}^5 - \text{Asn}^6 - \text{Leu} - \text{Gly} - \text{Lys} - \text{His} - \text{Leu} - (\text{Asn または Ser})^7 - \text{Ser} - (\text{Met または Leu})^8 - \text{Glu} - \text{Arg}^9 - \text{Val} - \text{Glu} - \text{Trp} - \text{Leu} - \text{Arg} -$$

Lys - Lys - Leu - Gln - Asp^{3*} - Val - His - Asn -
Phe^{4*} - Z (構造式 I)

(上式において)

3位のアミノ酸Bは、L-セリン、またはBがグリシンを示さない場合にはセリンと同等であるかセリンより大きい空間容積を有する他の天然または合成のD-もしくはL-アミノ酸から独立に選択されたものを示し、

6位のアミノ酸Jは、L-グルタミンまたは他の天然もしくは合成のD-アミノ酸、L-アミノ酸あるいはD-アミノ酸とL-アミノ酸との混合物から独立に選択されたものを示し、

9位のアミノ酸Xは、L-ヒスチジンまたは他の天然もしくは合成のD-あるいはL-アミノ酸から独立に選択されたものを示し、ただし原子団BがL-セリンを示しかつ原子団JがL-グルタミンを示す場合には、原子団XはL-ヒスチジンを示さず、また原子団BがL-セリンを示しかつ原子団XがL-ヒスチジンを示す場合には、原子団JはL-グルタミンを示さず、また原子団JがL-グルタミンを示しかつ原子団Xがヒスチジンを示す場合には、原子団BはL-セリンを示さず、

Zは、 $-COOH$ 、 $-COO-M$ (式中のM+は薬理的に適合性を有する陽イオンから選択されたものを示す)、 $-(C=O)NH$ 、またはヒト副甲状腺ホルモンまたはヒト副甲状腺ホルモン関連タンパク質のアミノ酸配列から独立に選択されたものを示す)で表わされる化合物、またはその医薬として受け入れることのできる塩を含有することを特徴とする医薬組成物に関するものである。

好適例においては、1位のアミノ酸はセリンであり、7位のアミノ酸はロイシンであり、16位のアミノ酸はAsnであり、

け入れることのできる賦形剤と混合した状態で含有する医薬組成物に関するものである。

他の面において、本発明は、hPTH (1~34) の構造を有し、Zが $-COOH$ または $-COO-M$ または $-(C=O)NH$ 、(好ましくはアミド)から選択されたものである化合物を、医薬として受け入れることのできる賦形剤と混合した状態で含有する医薬組成物に関するものである。

また、他の面において、本発明は治療処置を必要とする哺乳動物を治療処置する方法に関するものであり、この方法では治療有効量の構造式 I の化合物のペプチド類似体またはこの医薬として受け入れることのできる塩を、医薬として受け入れることのできる賦形剤と混合した状態で投与する。

また、他の面において、本発明は治療有効量の構造式 I の化合物を、経口、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、腔、腹腔、咽、舌下または鼻内手段によって投与することに関するものである。

また、他の面において、本発明は治療処置方法に関するものであり、この方法では構造式 I の化合物を用いてヒトにおけるガン、骨粗鬆症、高カルシウム血症または副甲状腺機能亢進症の病状状態を治療処置する。

他の面において、本発明は、医薬組成物において有用なPTHまたはPTH (1~34) の3、6、9位またはこれらの組合せにおいて配位されているポリペプチド配列を選択する方法に関するものであり、この方法は、

(a) 3、6、9位またはこれらの組合せにおけるアミノ酸が異なるD-もしくはL-天然アミノ酸または非天然アミノ酸により置換されているhPTH、bPTH、pPTH、hPTHrP、bPTHrP、hPTH (1~34)、bPTH (1

18位のアミノ酸はメチオニン、すなわちヒトPTHの配位された類似体である。

好適例においては、1位のアミノ酸はアラニンであり、7位のアミノ酸はフェニルアラニンであり、16位のアミノ酸はセリンであり、18位のアミノ酸はメチオニン、すなわちウシPTHの配位された類似体である。

他の好適例においては、Z、BまたはJは、以下のように独立に選択されたものを示す：

Zは $-COOH$ または $-COO-M$ または $-(C=O)NH$ を示し；

Bは合成アミノ酸を示し；

Bは天然に存在するアミノ酸を示し；

Jは合成アミノ酸を示し；

Jは天然に存在するアミノ酸を示し；

BはL-セリンを示し、JはLeu、Phe、Ala、Glu、SerまたはPheから選択され；あるいは

JはL-グルタミンを示し、BはAla、Phe、Gln、Glu、Lys、His、LeuまたはTyrから独立に選択される。

また、他の面において、本発明はJがL-セリン、Ala、Phe、Gln、Glu、Lys、HisまたはTyrから独立に選択されたものを示す化合物に関するものである。

さらに他の面において、JはL-グルタミン、Leu、Phe、Ala、Glu、SerまたはPheから独立に選択される。

また、他の面において、本発明は構造式 I の化合物またはこれらの医薬として受け入れることのできる塩を、医薬として受

~34) またはpPTH (1~34) のアミノ酸配列を作り；

(b) 特定の薬組織、膜または細胞を用いてアッセイを行って受容体結合性および活性を評価し；

(c) 特定の骨細胞を用いてアッセイを行って受容体結合性および活性を評価し；

(d)(i) 特定の薬組織、膜または細胞において高い結合性および高い活性を有し、かつ高い特定の骨細胞結合性および高い活性を有するペプチドアミノ酸類似体を、病状状態の薬組織、膜、細胞または骨を医学的治療処理するためのアゴニストとしてさらに評価するために、独立に選択し；あるいはまた

(ii) 高い結合性および高い活性を有するペプチドアミノ酸類似体を、特定の薬組織、膜または細胞におけるアゴニストとして、また低い特定の骨細胞結合性および低い活性を有するペプチドアミノ酸類似体を、病状状態の薬組織、膜または細胞に対するアゴニストとしてさらに評価するために、独立に選択し；あるいはまた

(iii) 特定の組織、膜および細胞において低い結合性を有し、かつ病状状態の骨に対して高い特定の骨細胞結合性および高い活性を有するペプチドを、アゴニストとして独立に選択し；あるいはまた

(iv) 組織、膜または細胞および骨細胞における高い結合性および低い活性を、ホルモン異常およびガンを医学的治療処理する際のアンタゴニストとして使用するために独立に選択し；

(e) アミノ酸類似体について次の種々のアッセイまたは毒性試験を行って有用な医薬の確認を行うことを特徴とする。

図面の簡単な説明

図1は、5種の哺乳類およびヒト並びにニワトリのPTHrP(1~34)からのPTH(1~34)の重排させた配列を示す。配列が同一である位置は実線で強調されている。

図1Aは、ヒトPTH、ウシPTHおよびブタPTHの1~84のアミノ酸を示す。

図2は、統計学およびパターンに基いた理論的方法により予想されるbPTH(1~34)およびヒトPTHrP(1~34)の二次構造の特徴を示す。

矢は予想される α -ヘリックス構造を示し、波線は可能性のある β -ターンを示す。

図3は、45%のトリフルオロエタノールの存在下および不存在下におけるペプチドの円二色性(CD)スペクトルである。208nmおよび222nmにおける最下点は、 α -ヘリックス構造の特性である。分析したペプチドは：図3AではbPTH(1~34)；図3Bでは[Tyr¹⁴]bPTH(7~34)アミド；図3CではhPTHrP(1~34)アミドである。

図4は、bPTH(1~34) (○)、[Tyr¹⁴]bPTH(7~34)アミド(Δ)およびhPLP(1~34)アミド(●)の α -ヘリックス含量に対するトリフルオロエタノールの影響を示す。 α -ヘリックス含量は、TaylorおよびKaiser(参考文献29)によって記載されているように、円二色性スペクトルのデコンボリューション(deconvolution)により測定した。

図5は、bPTH(1~34)およびhPTHrP(1~34)について一対のヘリックスモデルを図示的に示したものである。維持されている関連する配列の位置が示されている。

TH(1~34) (■)、[His¹]bPTH(1~34) (▽)、[Lys⁸]bPTH(1~34) (▼)および[Gln¹]bPTH(1~34) (◇)によるPTH受容体への競合的結合性を示す。

図6Fは、bPTH(1~34) (○)、[Ala¹]bPTH(1~34) (●)、[Phe¹]bPTH(1~34) (Δ)、[Leu¹]bPTH(1~34) (▲)、[Ser¹]bPTH(1~34) (□)および[Glu¹]bPTH(1~34) (■)によるPTH受容体への競合的結合性を示す。

図7は、3、6および9位に置換基を有するPTH(1~34)の類似体のUMR106-H5細胞における生物活性のグラフを示す。

図7Aは、bPTH(1~34) (○)、[Ala¹]bPTH(1~34) (●)、[Phe¹]bPTH(1~34) (Δ)、[Leu¹]bPTH(1~34) (▲)および[Tyr¹]bPTH(1~34) (□)によって生じたアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性を示す。

図7Bは、bPTH(1~34) (○)、[His¹]bPTH(1~34) (▽)、[Lys⁸]bPTH(1~34) (▼)および[Gln¹]bPTH(1~34) (◇)によって生じたアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性を示す。

図7Cは、bPTH(1~34) (○)、[Ala¹]bPTH(1~34) (●)、[Phe¹]bPTH(1~34) (Δ)、[Leu¹]bPTH(1~34) (▲)、[Ser¹]bPTH(1~34) (□)および[Glu¹]bPTH(1~34) (■)によって生じたアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性を示す。

疎水性コア、結合性領域およびトリガー領域が示されている。

図6は、3、6および9位に置換基を有するPTH(1~34)の類似体のイヌ腎臓形質膜における生物活性のグラフを示す。

図6Aは、bPTH(1~34) (○)および[Glu¹]bPTH(1~34) (■)、[His¹]bPTH(1~34) (▽)、[Lys⁸]bPTH(1~34) (▼)および[Gln¹]bPTH(1~34) (◇)によって生じたアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性を示す。

図6Bは、bPTH(1~34) (○)、[Ala¹]bPTH(1~34) (●)、[Phe¹]bPTH(1~34) (Δ)、[Leu¹]bPTH(1~34) (▲)および[Tyr¹]bPTH(1~34) (□)によって生じたアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性を示す。

図6Cは、bPTH(1~34) (○)、[Ala¹]bPTH(1~34) (●)、[Phe¹]bPTH(1~34) (Δ)、[Leu¹]bPTH(1~34) (▲)、[Ser¹]bPTH(1~34) (□)、[Glu¹]bPTH(1~34) (■)および[Phe¹]bPTH(1~34) (▽)により生じたアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性を示したものである。

図6Dは、bPTH(1~34) (○)、[Ala¹]bPTH(1~34) (●)、[Phe¹]bPTH(1~34) (Δ)、[Leu¹]bPTH(1~34) (▲)および[Tyr¹]bPTH(1~34) (□)によるPTH受容体への競合的結合性を示す。

図6Eは、bPTH(1~34) (○)、[Glu¹]bP

TH(1~34) (●)、[Phe¹]bPTH(1~34) (Δ)、[Leu¹]bPTH(1~34) (▲)および[Tyr¹]bPTH(1~34) (□)によるPTH受容体への競合的結合性を示す。

図7Eは、bPTH(1~34) (○)、[Glu¹]bPTH(1~34) (■)、[His¹]bPTH(1~34) (▽)、[Lys⁸]bPTH(1~34) (▼)および[Gln¹]bPTH(1~34) (◇)によるPTH受容体への競合的結合性を示す。

図7Fは、bPTH(1~34) (○)、[Ala¹]bPTH(1~34) (●)、[Phe¹]bPTH(1~34) (Δ)、[Leu¹]bPTH(1~34) (▲)、[Ser¹]bPTH(1~34) (□)、[Glu¹]bPTH(1~34) (■)および[Phe¹]bPTH(1~34) (▽)によるPTH受容体への競合的結合性を示す。

図8は、半アゴニスト[Phe¹]bPTH(1~34)による、bPTH(1~34)で刺激されたアデニル酸シクラーゼの活性の阻害を示す。

図8Aは、bPTH(1~34) (○)、[Phe¹]bPTH(1~34) (●)および濃度の異なる[Phe¹]bPTH(1~34) (Δ)の存在下におけるbPTH(1~34) (5nM)によって生じたイヌ腎臓形質膜におけるアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性を示す。

図8Bは、[Phe¹]bPTH(1~34) (○)および濃度の異なる[Phe¹]bPTH(1~34) (●)の存在下における0.2nMbPTH(1~34)によって生じたU

MR108-H5細胞におけるアデニル酸シクラーゼ(AC)の活性を示す。

発明の詳細な説明および好適例

定義

本明細書の全体において、アミノ酸の名称には肩付き数字が付いていることがある。この表示(例えば、Tyr¹)は、PTHの34位のアミノ酸がチロシンであることを示す。

「B¹」は、PTHの3位のアミノ酸B等を示す。

「J¹」は、PTHの6位のアミノ酸J等を示す。

「X¹」は、PTHの9位のアミノ酸X等を示す。

特定の雑誌を参照することは、普通、文章の最後に示した括弧内(参考文献)に示されている。

「bPTH」は、特定の1~84アミノ酸配列を有するウシPTHの配列を示す。

「bPTH(1~34)」は、短縮されたウシPTH配列である活性1~34アミノ酸配列を示す。

「cPTH」は、1~84ニトリPTH配列を示す。

「hPTH」は1~84ヒトPTH配列を示す。

「hPTH(1~34)」は、ヒトPTHの短縮されたアミノ酸配列を示す。

「hPTHrP」は、天然のヒト副甲状腺ホルモンに関連する139~141アミノ酸のタンパク質を示す。bPTHrPはウシ細胞から得たものである。hPTHrPはヒト細胞から得たものである。pPTHrPはブタ細胞から得たものである。

「hPTHrP(1~34)」は、天然のヒト副甲状腺ホルモン関連タンパク質の活性1~34アミノ酸を示す。

「pPTH」はPTHの1~84ブタアミノ酸配列を示す。

H	His	ヒスチジン
I	Ile	イソロイシン
K	Lys	リシン
L	Leu	ロイシン
M	Met	メチオニン
N	Asn	アスパラギン
Q	Gln	グルタミン
R	Arg	アルギニン
S	Ser	セリン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
W	Trp	トリプトファン
Y	Tyr	チロシン

変性された(普通でない、変性されたまたは置換された)アミノ酸は、上述のTrademark Official Gazetteの第47頁および第48頁に記載されている。普通でないかあるいは変性されたアミノ酸は、ここに参考として特別に記載した化合物を含有するが、これらの化合物に限定されない:

Aad	2-アミノアジピン酸
bAad	3-アミノアジピン酸
bAla	β-アラニン、β-アミノプロピオン酸
Abu	2-アミノブチル酸
4Abu	4-アミノブチル酸、ピペリジン酸
Acp	6-アミノカプロン酸
Ahe	2-アミノヘプタン酸
Aib	2-アミノイソブチル酸
bAib	3-アミノイソブチル酸

「pPTH(1~34)」は、pPTHの活性1~34正常ブタアミノ酸配列を示す。

先に説明したように、本発明を説明する際の便宜のために、IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature,

「Biochemistry, Vol. 11, 1726 (1972)」によって推奨され、ペプチドの技術分野において広く受け入れられているような、種々の一般的なアミノ酸に対する従来の略語を用い、これらの略語によってアキラルなアミノ酸であるグリシンを除いてL-アミノ酸を示す。ここで述べるすべてのペプチド配列は、N末端アミノ酸が左側にありC末端アミノ酸が右側にあるとする広く受け入れられている慣行に従って記載する。本発明の若干のポリペプチドでは、末端-COOH基がアミド基-C(=O)NH₂に転化されている。ポリペプチドは「アミド」として識別する。例えば、「Gly-アミド」は末端基-CH₂-C(=O)-NH₂を示す。

「天然のアミノ酸」とは、その技術分野においてよく知られているものを示す。これらのアミノ酸を挙示し、標準的略語はU. S. P. T. O. の刊行物、Trademark Official Gazette, 1990年5月15日発行、第33頁の48に示されている。これらのアミノ酸および略語をここに参照として特別に加入する。

以下に天然のアミノ酸を示す:

A	Ala	アラニン
D	Asp	アスパラギン酸
E	Glu	グルタミン酸
F	Phe	フェニルアラニン
G	Gly	グリシン

Apm	2-アミノピペリン酸
Dbu	2, 4-ジアミノブチル酸
Dpm	2, 2'-ジアミノピペリン酸
Dpr	2, 3-ジアミノプロピオン酸
EtGly	N-エチルグリシン
EtAsn	N-エチルアスパラギン
Hyl	ヒドロキシリシン
aHyl	allo-ヒドロキシリシン
3Hyp	3-ヒドロキシプロリン
4Hyp	4-ヒドロキシプロリン
alle	allo-イソロイシン
MeGly	N-メチルグリシン、サルコシン
Melle	N-メチルイソロイシン
MeLys	N-メチルバリン
Nva	ノルバリン
Nle	ノルロイシン
Orn	オルニチン
Cit	シトルリン

3, 4または5-フルオロヒスチジン

さらに、普通でないかあるいは変性された「アミノ酸」は、分子において別の基、例えばアルキル基または水酸基でさらに置換された置換アミノ酸を含む。代表的な置換アミノ酸は、例えば、4-ヒドロキシ-L-プロリン、サルコシン(また「Sarc」はN-メチルグリシンとして知られている)、D-3-(2-ナフチルアラニン)「D-Nal」、N¹-(アミノカルボキシル)-オルニチン「Cit」、ピログルタミン酸、オルニチン; pmp (1-B-メルカプト-β, β-ペンタメチ

レンプロビオン酸；Tyr (E)，4位の水酸基においてエチル化されているチロシンを含む。

「随意の」または「随意に」とは、後述の事象または状況が起るかもしれないし、起らないかもしれないことを意味し、またこの記載は上記事象または状況が起る場合および起らない場合を含むことを意味する。例えば、「随意に置換されたフェニル」とは、フェニルが置換されていることがあるかもしれないし、置換されていないかもしれないことを意味し、またこの記載は未置換フェニルおよび置換が行われているフェニルの両方を含むことを意味する；「次いで遊離塩基を酸付加塩に随意に転化する」とは、上記転化が本発明の範囲内にあると記載されているプロセスによって適切に実施されているかもしれないし、実施されていないかもしれないことを意味し、また本発明が遊離塩基を酸付加塩に転化するプロセスおよびこの転化が行われていないプロセスを含むことを意味する。

ここで用いるように、「医薬として受け入れることのできる塩」とは、親化合物の所望の生物活性を保持し、かつ不所望な毒物作用を全く示さない塩を意味する。このような塩の例は、(a) 無機酸、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、硝酸等によって生成する酸付加塩；および有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、タンニン酸、パモイック酸 (pamoic acid)、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、ナフタレンスルホン酸、ポリガラクトロン酸によって生成する酸付加塩；(b) 金属 (M) 陽イオン、例えば、ナトリウム、カリウム、亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウム等との塩；

と考えられる残基を有し、他方NH₂領域のヘリックスは受容体にとって活性化に必要である1〜8ペプチドセグメントの部分またはすべてを有する (Gsで表わされるアデニル酸シクラーゼの刺激性GTP結合性成分への結合の誘発)。同様に、2個のらせんセグメントがPTHrP (1〜34) について予測される。これらのセグメントはペプチドの74% (23/34) ~ 94% (32/34) を有する。Chou-Fasman (参考文献22) による計算はPTH (1〜34) の10〜13位におけるβ-ターンを示唆し、PTHrPの対応する領域におけるβ-ターンを強く予測させる。

bPTH (1〜34)、(Tyr¹⁴) bPTH (7〜34) アミドおよびhPTHrP (1〜34) アミドの円二色性 (CD) スペクトルが、トリフルオロエタノール (TFE) の存在下および不存在下において、水性緩衝液中で得られた。TFEの不存在下において、bPTH (1〜34) は208 nmに最下点を、222 nmの領域に広い肩部を有するスペクトルを生じた (図3)。45%のTFEの存在下において208 nmにおける最下点は一層深くなり、第2の最小点が222 nmに現れた。これらの結果は、bPTH (1〜34) におけるα-ヘリックス構造の存在を示唆するものであって、上述の構造の存在はTFEの存在によって増強される。精肉率は200 nm未満の波長において正となり、これは少量の残留β構造が存在することを示す。驚くべきことには、この特性もまたTFEにより強化された。hPTHrP (1〜34) アミドおよび(Tyr¹⁴) アミド (7〜34) が示すスペクトル特性は定性的に類似していた。

α-ヘリックス含量 (参考文献29記載のTaylorおよびKaiser

あるいはN, N'-ジベンジルエチレンジアミンまたはエチレンジアミンから生成する有機陽イオンとの塩；あるいは(c) (a) と (b) との組合せ、例えば、タンニン酸の亜鉛塩等である。

発明の説明

本発明では、入手できるかあるいは誘導される構造-活性データと、PTHまたはPTHrPの分子構造に関する予測および/または実験による決定とを組み合わせ、高親和性受容体の結合性および活性において重要な役割を演ずることが予想される1〜34 (またはこれより大きい) アミノ酸配列における重要なアミノ酸残基を特定する。3, 6あるいは9位またはこれらの組合せにおいて置換されているアミノ酸を有する類似体を合成し、親和性、電荷および大きさまたは生物活性の影響について評価する。インビトロバイオアッセイを、イヌ腎臓膜およびラット腎細胞およびヒト腎細胞におけるPTH受容体の結合性およびアデニル酸シクラーゼの活性について説明する。これらのインビトロのアッセイの結果は、インビトロ生物活性を予知するものである。

2種の半経験的方法を用いて哺乳類PTH (1〜34) およびPTHrP (1〜34) の二次構造の特徴を予測した — 統計的方法 (参考文献22, 23) およびパターンに基いた方法 (参考文献24, 25) (図2)。PTH (1〜34) では、ペプチドの68% (23/24) ~ 82% (28/34) を含む2個のらせんセグメントが、先に示唆されたように (参考文献26, 27)、予測される。推定されるCOOH領域のヘリックスはホルモンの受容体への結合性に直接的な役割を演ずる

の方法によるCDスペクトルのディコンボリューションにより評価した) およびこれらのペプチドに対する溶液の両親媒性を図4に示す。これらのスペクトルは、TFE濃度の増加に従って漸次増加するα-ヘリックス構造と一致した。45%のTFEの存在下において、bPTH (1〜34) およびhPTHrP (1〜34) のアミドはそれぞれα-ヘリックス領域内に25±3および24±3個の残基を有することが計算によって分った。これらの結果は、上述のChou-Fasmanによる分析によって予測される。また、PTH (7〜34) 類似体のCDスペクトルもChou-Fasmanによる分析と一致した。PTH (7〜34) はbPTH (1〜34) またはhPTHrP (1〜34) アミドのいずれかより7〜8個少ないα-ヘリックス残基を有し、このことはPTHのアミノ末端1〜6ドメインがTFEの存在下にα-ヘリックス構造をとるかあるいは誘発することを示唆する直接の証拠を提供する。この結果は、(Tyr¹⁴) bPTH (1〜34) アミドおよび(Tyr¹⁴) bPTH (7〜34) アミドがそれぞれ30%のTFEの存在下にそれぞれ24および18α-ヘリックス残基を示すことが計算された第2実験により確認された。

TFEの不存在下に、bPTH (1〜34)、hPTHrP (1〜34) アミドおよび(Tyr¹⁴) bPTH (7〜34) アミドは7〜10のα-ヘリックス残基を有することが計算され、これは厳密に極性の溶液条件下に残存する第2α-ヘリックスドメインと一致する。この後者のドメインは、PTHおよびPTHrPの残基17〜34の間に存在すると予測される。これらの結果は、両親媒性化合物の不存在下における水性条件下に、bPTH (1〜34) およびhPTH (1〜34) (37

～38)については12未満の α -ヘリックス残基であり、bPTH(7～34)については9の α -ヘリックス残基であるとした従来の評価(参考文献37)に類似している。PTH(7～34)類似体の二次構造に対するTFEの作用は、増加する溶媒の両親媒性の条件下において特定のCOOH-領域ヘリックスドメインの延長部を反映していることがある。

これらの結果は、適切な溶媒条件下において、bPTH(1～34)アミドとbPTHrP(1～34)アミドとの両方が主として α -ヘリックスである大きな二次構造を有することを示す。これらの結果に基づいて、PTHおよびPTHrPの1～34配列の三次元モデルを、アミノおよびカルボキシル末端 α -ヘリックスを一緒に詰め込むことによって構成した(図5)。各ヘリックスの面における疎水性接触面をRichmondおよびRichardsの方法(参考文献40)を用いて位置決めした。ヘリックス組立体をCohen等の方法(参考文献41)によって構成した。鎖の連結性を維持するために、ヘリックス内の詰め込み角(packing angle)は必然的に $+20^\circ$ または -20° ($+180^\circ$ または -160°)になった。

このモデルの関係において、維持されている4, 7および8位並びに20, 23, 24, 28および31位の置換基は、疎水性コア中に埋められている残基を含む。これらの残基は、折り重ねた構造の安定化に寄与すると考えられる。対照的に、維持されかつ溶媒に曝された3, 6, 9および12位の残基は、リガンド-受容体界面において重要な相互作用に関与していると考えられる。3または6または9位で一置換されたかあるいは8および6位で二置換されたbPTH(1～34)の23個の類似体を、一般にペプチドアミノ酸合成法に従って、特に真

映の部分に見い出されるようにして合成し、PTH受容体へのこれらの結合性における不活性並びにイヌ腎臓の形質膜およびUMR106-H5ラット骨肉腫細胞におけるアデニル酸シクラーゼの活性について試験した(図6および7、並びに表1および1A)。これらの置換基が受容体への結合性に及ぼす影響は、腎臓および系において類似していた。3位において、Ala、Leu、GlnおよびHisを含む種々のアミノ酸配列は十分に許容される(結合能力の保持率30%以上)が、Lys、PheおよびTyrは余り十分には許容されない(結合能力の保持率2～15%)。(Glu)³bPTH(1～34)は、受容体結合活性の10%未満を保持していた。6位における置換の結果、bPTH(1～34)の活性のわずかに1%(腎臓の膜)および4%(骨肉腫細胞)を保持していた[Phe⁶]bPTH(1～34)を除いて、適度に減少した結合活性を有する類似体が生成した。

一般に、結合能の減少は、UMR106-H5細胞中のアデニル酸シクラーゼを刺激するのに必要なペプチド断片の匹敵する増加と平行していた。例外は[Lys³]および[Phe⁶]bPTH(1～34)であり、これらはそれぞれシクラーゼ刺激活性において、これらの結合能から予測される値より不均等に小さい損失および大きい損失を示した。対照的に、實際上すべての類似体が、腎臓の膜において不均等に低いシクラーゼ刺激能力を示した。腎臓の膜の結合能とシクラーゼ刺激活性との間の同様な不均等がPTHrP(1～34)について記載されている(参考文献14)。従って、大部分の類似体並びにPTHrPは、イヌ腎臓の形質膜中のPTH受容体をアデニル酸シクラーゼの活性化に結び付ける際に、bPTH(1～34)よ

り明らかに効果が小さい。

4個の合成された類似体は、アデニル酸シクラーゼアッセイにおいて半アゴニスト活性を示した。これらの類似体のうちの3個(Phe³、Tyr³、Phe⁶)は疎水性残基が置換されていたが、第4類似体は6位においてSerを置換するためにGlnを有していた。半アゴニストの挙動を示した類似体は、程度が若干異なるが、骨および腎臓の両方の系において同様であった。弱い半アゴニストは、完全アゴニストPTHrP(1～34)およびbPTH(1～34)に対するアデニル酸シクラーゼの応答を競合的に阻害することができた(図8)。

アッセイをUMR106-H5細胞を用いて実施した。これらのアッセイは、Cohen等(1991, J. Biological Chem., 266(3), 1997)および実験の部、例えば、実施例11に記載されているようにして実施した。

UMR106-H5細胞において、いくつかの3位類似体は、腎臓のアデニル酸シクラーゼと混合した場合に、アデニル酸シクラーゼ活性についての増大した能力(Leu³、His³)またはアデニル酸シクラーゼにおける増加した活性(Tyr³)を示した。これらの結果は、これらの類似体が比較的特異性であることを示す。

試験した類似体は受容体結合性アデニル酸シクラーゼのアッセイにおいて広範囲の能力を示したが、CD分光法により証明されたように、置換は二次構造にほとんど影響を与えなかった。 α -ヘリックス含量の計算値はこれらのペプチドについて29～36%の間でのみ変化し、例外は[Glu³]bPTH(1～34)であり、これは19%の α -ヘリックス含量を示した(表1)。(Glu³)bPTH(1～34)の減少した α -

ヘリックス含量は、両アッセイ系において生物活性の顕著な損失と関連していた。残りの類似体については、生物活性における変化は二次構造における主要な変化に依存しないと考えられた。

下記の表1において、bPTH(1～34)の能力および活性を100%として示し、ペプチド類似体をbPTH(1～34)に対する百分率で記載した。列挙した腎臓の膜のアッセイ値は、腎臓組織受容体を使用した場合のポリペプチド類似体の作用を表す。UMR106-H5アッセイ値はラットの骨肉腫受容体を使用した場合の、ペプチド類似体の作用を反映している。Sa05-2アッセイ値は、ヒト骨肉腫受容体についての、ペプチドの作用を反映している。

活性は、アデニル酸シクラーゼを刺激する固有の能力であると定義し、完全アゴニストは100%の活性を有するとする。完全アンタゴニストは0%の活性を有する。半アゴニストは>0および<100%活性を有する。いずれのアッセイにおいても、理型のアンタゴニストは100%の結合性(B)および0%の活性(AC)を有する。いずれのアッセイにおいても、超アゴニストは、100%より大きい(例えば200%)の結合性(B)および100%の活性(AC)を有する。

好適例は骨特異的ペプチド類似体であって、これは腎臓の系膜において0%に近い結合性(B)および0%の活性を有し、UMR106-H5アッセイにおいて100%の結合性および活性に近い値またはこれより大きい結合性および活性を有する。

例えば、表1において類似体(Tyr³bPTH(1～34))は、腎臓組織において低い結合性および活性を示し、かつUMR106-H5アッセイにおいて高い結合性および活性を有す

る好ましいパターンを示す。

表 1 A では、h P T H (1 ~ 3 4) の能力および活性は、100%として記載され、ペプチド類似体についてはh P T H (1 ~ 3 4) (ヒト) に対する百分率で記載されている。

表 1 - 1 - ウシPTHのアッセイ結果

変換の原 イヌ	能力		ラット骨		ヒト骨		ヘリックス%	
	能力	活性	能力	活性	能力	活性	能力	活性
	(B)	(AC)	(B)	(AC)	(B)	(AC)	(B)	(AC)
BPR(1~34)	100	100	100	100	100	100	35	91
ala ¹	79	100	38	79	80		30	100
leu ¹	44	3.3	45	52	92		ND	ND
phe ²	22	1	8	2	80		ND	ND
ala ³	57	35	47	100	100		31	95
glu ⁴	<0.1	<0.1	>90	0.2	<0.1	>95	19	93
lys ⁵	14	1.5	78	3.5	14	85	29	81
his ⁶	55	2.5	100	9	75	100	35	84
tyr ⁷	2	1.2	28	0.9	2.5	100	34	89
leu ⁸	12	3.5	84	6.3	7	81	33	94
phe ⁹	1.3	1.4	28	4.5	1.1	37	33	89
ala ¹⁰	54	4	87	12	22	90	33	94
glu ¹¹	72	12	100	48	45	100	36	90
ser ¹²	15	1.3	50	33	4.7	35	ND	ND

3. 6および9位において変性されているb P T H (1 ~ 3 4) の類似体に関するPTH受容体結合性(B)およびアデニル酸シクラーゼ活性(AC)についての能力および最大活性。変性されている類似体はZ=アミドである。

B, ACおよびAC*の定義は表1Aを参照されたい。

両方の値をPTH(1~34)に対する%として示し、PTH(1~34)に100%の値を割り当てた。変性されているペプチドの最大有効用量によって生じたアデニル酸シクラーゼの活性を、b P T H (1 ~ 3 4) によって生じた活性に対する値で示す。また、実験の部に記載したように、30%のトリフルオロエタノール(TFE)の存在下に得た円二色性(CD)スペクトルから計算した α -ヘリックス構造の%を示す。

表 1 (A) - ヒトPTHのアッセイ結果

変換の原 イヌ	能力		活性	BPR(1~34)		ラット骨		SACS2 類似 ヒト骨		ヘリックス% TPE	(0%)	(30%)
	(B)	(AC)		(B)	(AC)	(AC)	(AC)					
								能力	活性			
ala ¹	100	100		100	100	100	100	100	100	35	91	
ala ²	7	2	88	0.8	1.4	100	100	100	100	37	86	
ser ¹	4	0.4	57	0.4	0.6	97				32	83	
leu ¹	0.2	1.8	12	0.6	<0.1	80				40	85	
ala ³	25	4	80	8	11	100				39	91	
ala ⁴	0.7	1.5	35	1.8	0.6	84				ND	ND	
lys ¹ ala ¹	0.5	2	9	0.5	0.1	85				36	83	
his ¹ ala ¹	0.2	2	9	<0.1	0.3	72			10	8		
lys ² ala ¹	89	10	88	<0.1	0.4	44			14	8		
his ² ala ¹	8.9	3	58	10	10	100			12	100		
				0.3	0.5	100			5	100		

3, 6 および 9 位において変性されている bPTH (1~34) の類似体に関する PTH 受容体結合性 (B) および アデニル酸シクラーゼ活性 (AC) の能力および最大活性。変性されている類似体は Z=アミドである。

AC は最大酵素活性の半分を有する変性されているペプチドの濃度である (すなわち、曲線の転移部の中間点である一添付した図面から決定することができる)。

AC* は 100% とした基準 PTH に対する多用量の変性されているペプチドの酵素活性であると定義する。

両方の値を PTH (1~34) に対する % として示し、PTH (1~34) に 100% の値を割り当てた。変性されているペプチドの最大有効量によって生じたアデニル酸シクラーゼの活性を、bPTH (1~34) によって生じた活性に対する値で示す。また、実験の部に記載したように、30% のトリフルオロエタノール (TFE) の存在下に得た円二色性 (CD) スペクトルから計算した α -ヘリックス構造の % を示す。ND は測定していないことを示す。

表に示した CD のデータは、PTH (1~34) および PTHrP (1~34) が、アミノおよびカルボキシルの両末端ドメインにおいて α -ヘリックス構造をとるという理論的根拠に基く本発明者等の予測と一致する。従って、ペプチドをアミノ末端 α -ヘリックスおよびカルボキシル末端 α -ヘリックスを有する平衡状態にある構造の集団と考えた場合には、TFE 濃度の増加に従って平衡がヘリックス含量の増加する方向に移動すると考えられる。従来の結果は、ジミリスチルホスファチジルコリン小胞の存在下に hPTH (1~34) の α -ヘリックス含量が同様に増加することを示していた (参考文献 42)。

9) は 5.4 Hz の平均 $^1J_{\alpha\beta}$ を有する。C-末端領域における残基 24~30 は 6.1 Hz という類似の平均 $^1J_{\alpha\beta}$ を有する。しかし、PTHrP (1~34)、PTHrP (1~25) および PTHrP (7~34) の水中における CD スペクトルはアミノ末端ヘリックスのみの証拠を示すものとして解釈された。また、bPTH (13~34) および bPTH (19~34) についての CD スペクトルも、水性条件下においてこれらのペプチドに α -ヘリックス構造が存在するにしても、ほとんど存在しない程度であることを示した (参考文献 37)。

ヘリックス間相互作用またはヘリックス自体のいずれかを不安定化する PTH (1~34) の変性は、その結果として生物活性が減少する。これは、試験した PTH の類似体の場合であると考えられる。Met¹ の SOMe t (bPTH (1~84) において) への酸化により、あるいは [Gln²², Lys²², Leu²²] hPTH (1~34) における Leu²² の Lys²² への置換のいずれかによる疎水性コアの破壊の結果として、生物活性の顕著な (10~50 倍) 損失が生じる (参考文献 49, 50)。対照的に、Met を Nle¹ に、Met を Met-ブチル¹ に、Met を Met-ブチル¹ に交換または付加した同族体、または NPS-/NAPS-TP²² 類似体におけるように、疎水性部分を交換または付加しても、その結果生物活性はほとんどまたは全く損失されない (参考文献 4, 51~53)。C-末端カルボン酸を除去した類似体 (PTH (1~34) アミド; [Tyr²⁴] PTH (1~34) アミド; [D (Tyr²⁴) PTH (1~34) アミド] では生物活性が増加した (参考文献 54)。残基 23~34 が α -ヘリックス

また、特定の受容体の非極性環境も PTH および PTHrP の高度に構造的な形態 (highly structured form) を安定化することができると考えられる。

提案されているモデルは、疎水性コア、各ヘリックスの疎水性表面およびヘリックス間のループを有するドメイン構造を与える。bPTH において疎水性表面の面積を最大限に埋め込むために、およびヘリックス双極子間の好ましい相互作用を促進するために (参考文献 43)、相対的に平行な配置 (軸間角 (interaxial angle) ~160°) が予測される (図 5 参照)。この詰め込み角は、一般にらせんタンパク質に存在する (参考文献 44, 45)。類似し対をなすらせん構造が 28 残基トリポリマーペプチドについて X 線結晶学によって示されている (参考文献 46)。

最近、Barden および Kemp (参考文献 28) は、2D-NMR および CD 分光学を用いて PTHrP (1~34) アミドおよびこのフラグメントの三次元構造を pH 4.5 において特徴づけることを報告した。彼等は、ペプチドが、1 個の N 末端ヘリックス (残基 3~8)、2 個の逆ターン (reverse turn) (残基 10~13 および 16~19)、および C-末端コイル (残基 23~34) からなる構造をとると結論した。最も重要なことは、これらの研究者が離れている残基間の NOE クロスピーク (cross-peak) を検出した (参考文献 2~31, 8~28, 1~24) ことで、これによりコンパクトな構造の存在が確認される。らせん構造は、 $^1J_{\alpha\beta}$ 結合定数および PTHrP 類似体の CD スペクトルの解析に基いて、カルボキシル末端領域ではなくアミノ末端領域に起因するとされた。Barden および Kemp よりヘリックスであると確認された領域 (残基 3~

を形成する場合には、ペプチド双極子の相対的配列は、約 -1/2e に等しい有効な負電荷を C-末端において生じさせる (参考文献 43)。C-末端 COO⁻ は、双極子との好ましくない相互作用によってヘリックスを不安定化する。対照的に、C-末端アミドはヘリックスを安定化し、おそらく生物学的能力を増加させる。同様に、Lys¹⁸ (提案されたループ領域内) は PTH および dPTHrP における推定 N 末端の双極子を安定化する。実際に、PTH (1~34) から Lys¹⁸ を除去すると、その結果顕著に低下した生物活性を有するペプチドが生成する (参考文献 55)。対照的に、Met¹ の酸化はヘリックス間の相互作用を不安定化すると予測されず、また [SOMe t¹] bPTH (1~84) は本来のホルモンの活性の 50% 近くを保持する (参考文献 49)。

本発明においては、分光学的方法と予測の方法との組合せを用いて PTH (1~34) についての構造モデルを展開する (F.B. Cohen 等「J. Biol. Chem. 266: 1997, 1991」)。このペプチドは、ループにより隔離された 2 個の両親媒性 α -ヘリックスからなると考えられる。アミノ領域の α -ヘリックスはアミノ末端またはこの付近において始まり、約残基 10 まで延在する。第 2 α -ヘリックスは約残基 18 において始まり、カルボキシル末端まで延在する。ヘリックスは、逆平行に互いの上に折り返されて重なり、この結果受容体結合性の中心に含まれると予測される外側に面した極性残基を有する疎水性コアが形成すると示唆される。

このような 3 個の極性残基: 3 位の Ser; 6 位の Gln; および 9 位の His を変性する。これらの残基は既知のすべての PTH/PTHrP 族 (図 1) 中に維持され、従って重要な

受容体決定基と直接に相互作用することがある。いずれの場合においても、類似体を合成して電荷、疎水性および側鎖容積の変化の影響を評価する。

(i) 結合が起こるとアデニルシクラーゼを活性化化する能力が変化する類似体

本発明においては、いくつかのペプチドは最大有効濃度におけるアデニルシクラーゼ活性化能力の低下を示した。このような類似体の固有活性の低下は、結合させた後に受容体を完全に機能的なコンホメーションに転化することができないことに反映している。大部分について、この性質を示す類似体は、3、6および9位において、通常の陽性のアミノ酸に置換された疎水性残基を有する。3位において、PheまたはTyrをSerによって置換すると、PTH(1~34)の固有活性が顕著に減少した。後述のように、この作用は腎臓アッセイに特異的なものであって、骨細胞では明らかでない。低下した生物活性は、3位に導入された疎水性側鎖の容積に直接関係し、これは、この残基が受容体ポケット内に立体的に抑え込まれていることを示唆する。有意な負の相互関係が、3位における側鎖容積(Richardsの方法(参考文献57)によって計算した)と、それぞれのアッセイにおける生物活性との間で得られた。種々のアッセイにおいて、相関係数は-0.68(確率pは0.05未満)~-0.92(確率pは0.01未満)の範囲内であった。PTH(1~34)の6位におけるGlnによるPheの置換により、腎臓と骨細胞との両方におけるアデニルシクラーゼアッセイにおける固有活性が顕著に低下している類似体が生じた。疎水性残基は9位において極めて僅か許容されるにすぎず、HisをAla、LeuまたはPheによって置換することに

より、腎臓のアデニルシクラーゼアッセイにおける固有活性の損失が生じた。一般に、これらの位置における陽性アミノ酸での置換は、固有生物活性を一層小さくする。例外はSer⁹およびSer⁹ PTH(1~34)であり、これらはいずれも活性の低下を示した。

受容体結合性活性を保持しているが、固有活性の低下している類似体は、半PTHアンタゴニストとして作用すると予測される。このことは、試験した2種の半アゴニスト[Phe⁶]および[Phe⁹] PTH(1~34)の場合であることが分かった。単一の置換によりPTH(1~34)が半アンタゴニストに転化されることを見出したのは新規な知見であり、有効なPTH受容体アンタゴニストを開発する新規な方法を示唆するものである。

(ii) 二次構造に及ぼす置換の影響

二次構造に及ぼすアミノ酸置換のPTH(1~34)の影響を評価するために、本発明の技術分野および本発明においては、円二色性を用いる。水性溶液条件下において、實際上すべての置換類似体は30~40%のα-ヘリックス含量を示す。唯一の例外は[Glu⁹] PTH(1~34)で、これは僅かに19%のα-ヘリックス含量を示し、生物活性の顕著な減少を示した。30%トリフルオロエタノール中、すなわち形質膜穿透膜において予測されるものに類似した溶媒条件においては、単一の残基置換を有するすべての類似体が85%のα-ヘリックス含量を示す。従って、固有活性の上述の損失は、類似体の二次構造の全体的変化に起因するものではない。以下に記載するように、残基3および9における置換の組み合わせは、受容体活性構造および生物活性に極めて大きい影響を及ぼす。

(iii) 変化した標的細胞選択性を有するペプチド類似体

ある変性の結果、腎臓対骨細胞バイオアッセイにおける種々の損失が生じる。Ser⁹を塩基性残基LysまたはHisによって置換することにより、骨細胞において実質的な活性を保持しているが、腎臓の膜においてPTH(1~34)の活性の3%を有する類似体が生ずる。同様に、[Glu⁹]および[Ala⁹] PTH(1~34)は、ラット骨細胞のバイオアッセイにおいて腎臓の膜のバイオアッセイにおけるより有意に大きな活性を保持する。[Ala⁹] PTH(1~34)の標的細胞選択性は、類似体の効果がヒト骨細胞と腎臓の膜において等しいので、種(species)に依存すると考えられる。対照的に、[Lys⁹] PTH(1~34)は両方の骨細胞アッセイにおいて増大した生物活性を示し、従って腎臓と骨において両方におけるPTH受容体-アデニルシクラーゼ系を識別することができる。

(iv) 2ヶ所で置換を行ったペプチド類似体

それぞれ単独では活性に大きな影響を及ぼさない3位および6位における置換を、対をなすように導入して両位置において置換されている一連の類似体を生成する。Lys³Ala⁶b-PTHおよびHis³Ala⁶b-PTHは、骨細胞および腎臓の膜において低い受容体親和性および低いシクラーゼ刺激活性を示す。5位のグルタミンをアラニンまたはグルタミン酸によって、あるいは3位のセリンをリシンまたはヒスタミンによって単一の置換を行うと固有活性に及ぼす影響が最小になるため、この結果は、PTH受容体の効果的な活性化がリガンドにおける3位と6位との間の相互作用を含むことを示唆する。6位においてアラニンがグルタミンによって置換されている類

似体のヘリックス含量はヘリックス含量の減少を示すので、この相互作用は明らかにらせん構造を維持する。対照的に、Lys³Ala⁶およびHis³Ala⁶はすべての系において完全アゴニストである。6位に小さい側鎖を有する場合には、3位の塩基性残基は、らせん構造を不安定化する他のアミノ酸置換のように、不安定化作用が顕著であり、また結合性に極めて有害である。

9位のアミノ酸は、天然のヒスチジンであるか、あるいは好ましくは容易に正電荷を受け入れることができ、従ってらせん構造を変性することができるもの、例えばチロシン、トリプトファン、フェニルアラニン、ジアミノ酪酸、D-Nal、オルニチン、シトルリン、3、4または5-フルオロヒスチジン等である。

医薬として有用な変性ポリペプチドの選択

本発明の他の観点では、アッセイおよびその結果を用いて、さらに評価するために活性であるこれらの変性ペプチドを選択して有用な医薬を製造することができる。

この結果はペプチド(例えばPTH(1~34))をここに記載するように3位、6位または9位で成りはいはそれらの組合せで変性させ、特定の組織、膜または細胞を用いてアッセイを実施し、受容体の結合性および活性を評価し、さらに、特定の骨細胞を用いるアッセイを行いソリッド(solid)骨受容体の結合性および活性を評価することにより達成される。

アッセイの結果に基づき、4種の有用な医薬を決定する。すなわち

(d)(i) さらに評価するために特定の組織、膜または細胞において高い結合性および高い活性を有し、かつ高い特定の骨

細胞結合性並びに高い活性を有するペプチドのアミノ酸類似体を、病状状態の組織、膜、細胞または骨を医学的治療するためのアゴニストとして独立に選択し；あるいはまた

(d)(ii) 低い結合性および高い活性を有するペプチドアミノ酸類似体を特定の組織、膜、または細胞において医学的に治療するための特定のアゴニストとしてまた高い細胞結合性および低い活性を有するペプチドアミノ酸類似体を病状状態の組織、膜、または細胞もしくは細胞に対するアゴニストとしてさらに評価するために独立に選択し；あるいはまた

(d)(iii) 特定の組織、膜および細胞において、低い結合性および低い活性を有しかつ病状状態の骨に対して高い特定の骨細胞結合性および高い活性を有するペプチドをアゴニストとしてさらに評価するためにこれらのペプチドを個別に選択し；あるいはまた

(d)(iv) 組織、膜または細胞中および骨細胞における高い結合性および低い活性を、ホルモン異常およびがんの医学的治療する際のアンタゴニストとして用いるために独立に選択する。

次の異なる標準アッセイまたは毒性測定を有用な医薬の同定に従ってアミノ酸類似体につき実施する。

1例においては、(d)(i)工程で特定の組織、膜または細胞における高い結合性および高い活性ならびに特異な骨細胞の高い結合性および高い活性はそれぞれ対照ペプチドのものより約50%以上高い。

1例においては、(d)(ii)工程で特定の組織、膜または細胞における医学的処置用アゴニストとしての高い結合性および高い活性は対照ペプチドのものより約50%以上高く特定の骨

細胞の低い結合性は約5~10%で骨細胞の低い活性は約10%以下である。

1例においては、(d)(iii)工程で、特定の組織では低い結合性は10%未満であり低い活性は骨の病気の条件に対し約5~10%であり、さらに特定の骨細胞の高い結合性および高い活性は約50%以上である。

1例においては、(d)(iv)工程で、ホルモン異常およびがんの医学的治療に医薬アンタゴニストとして用いるために、組織、膜または細胞もしくは骨で高い結合性は約50%より高く低い活性は本質的に5~10%である。

組織等ではヒトまたはウシ腎臓から誘導するのが好ましい。

このようにして、本発明の選択処理に基づき(glu²⁸またはala²⁸)bPTH(1~34)アミドは組織用または骨用のアゴニストとして有用である、(d)(i)。

同様に、phe⁸bPTH(1~34)アミドは組織等における病気の条件に対する特定のアゴニストとして有用であるとして選択する、(d)(ii)。

同様に、phe⁸bPTH(1~34)アミドは骨における病気の条件に対する特定のアゴニストとして有用であるとして選択する、(d)(iii)。

また、ser⁸bPTH(1~34)アミドは組織および骨における病気の条件に対するアンタゴニストとして選択する、(d)(iv)。

要約すると、本発明は受容体において生物学的に活性のあるコンホーメーションが約12残基のループにより結合したNおよびC末端の両側様性らせんからなるPTH(1~34)およびPTHrP(1~34)の構造に対するモデルを記載する。

相互らせん状の相互作用は恐らく受容体の結合性および活性化の決定基を含む外部に面する疎水性残基を有する疎水性中心を生ずる。2つのかかる外部に面する位置で置換した類似体の合成はアミノ酸の3位、6位または9位が受容体の結合および活性化の重要な決定基に寄与することを示すことを可能にする。さらにこれらの位置での構造上の制約の描写は強いPTHアンタゴニストの合理的な設計を促進する。

本発明の特定例はセリンが1位にあり3位のアミノ酸が異なる次のものを含む。原子団A'はhPTH、pPTH、bPTH、もしくはそれらのZ=COOHまたはCOO⁻+Mあるいは(C=O)-NH₂の末端をなす誘導体の1~34活性単位残りのペプチド、もしくはhPTHまたはbPTHあるいはhPTHrPの残りの4~84配列から個別に選択する。

H₂N-Ser-Val-Lys-A' ;
H₂N-Ser-Val-Phe-A' ;
H₂N-Ser-Val-Leu-A' ;
H₂N-Ser-Val-Ala-A' ;
H₂N-Ser-Val-Thr-A' ;
H₂N-Ser-Val-Cys-A' ;
H₂N-Ser-Val-Tyr-A' ;
H₂N-Ser-Val-Asp-A' ;
H₂N-Ser-Val-Glu-A' ;
H₂N-Ser-Val-Asn-A' ;
H₂N-Ser-Val-Gln-A' ;
H₂N-Ser-Val-Lys-A' ;
H₂N-Ser-Val-Arg-A' ;
H₂N-Ser-Val-His-A' ;

H₂N-Ser-Val-Val-A' ;
H₂N-Ser-Val-Ile-A' ;
H₂N-Ser-Val-Trp-A' ;
H₂N-Ser-Val-Met-A' ;
H₂N-Ser-Val-Pro-A' ;
H₂N-Ser-Val-Nle-A' ;
H₂N-Ser-Val-D-Nal-A' ; または
H₂N-Ser-Val-Orn-A' 。

ここに記載した変性ペプチドのアミノ酸配列のすべてにおいては、Z=アミドが好ましい。Z=アミドの類似体は次の任意の請求の範囲に記載したペプチド配列が一層好ましい。

次表の類似体では、1位のアミノ酸はアラニンであり、3位のアミノ酸は変化する。

H₂N-Ala-Val-Ala-A' ;
H₂N-Ala-Val-Thr-A' ;
H₂N-Ala-Val-Cys-A' ;
H₂N-Ala-Val-Tyr-A' ;
H₂N-Ala-Val-Asp-A' ;
H₂N-Ala-Val-Glu-A' ;
H₂N-Ala-Val-Asn-A' ;
H₂N-Ala-Val-Gln-A' ;
H₂N-Ala-Val-Lys-A' ;
H₂N-Ala-Val-Arg-A' ;
H₂N-Ala-Val-His-A' ;
H₂N-Ala-Val-Val-A' ;
H₂N-Ala-Val-Leu-A' ;
H₂N-Ala-Val-Ile-A' ;

$H_2N - Ala - Val - Pro - A'$;
 $H_2N - Ala - Val - Phe - A'$;
 $H_2N - Ala - Val - Trp - A'$;
 $H_2N - Ala - Val - Met - A'$;
 $H_2N - Ala - Val - Nle - A'$;
 $H_2N - Ala - Val - D-Nal - A'$; または
 $H_2N - Ala - Val - Orn - A'$.

これらの類似体でより好ましいのは A' が hPTH の 4 ~ 3 4 アミノ酸配列、特に $Z = - (C=O) - NH_2$ の末尾をなす誘導体を有するものである。

本発明の付加的な特定例は 1 位および 3 位のアミノ酸がセリンで、6 位のアミノ酸が原子団 J で置換される次の類似体を含み、原子団 B' は hPTH、または bPTH、または pPTH もしくはそれらの $Z = -COOH$ または $-COO^- + M$ またはアミド誘導体の 7 ~ 3 4 活性単位の残りのペプチドの残留物、あるいは hPTH または bPTH または pPTH または hPTH rP の 7 ~ 8 4 配列から個別に選択する。

$H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Ala - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Thr - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Cys - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Tyr - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Asp - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Glu - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Asn - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Ser - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Lys - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Arg - B'$;

$H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Ser - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Lys - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Arg - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - His - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Val - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Leu - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Ile - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Pro - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Phe - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Trp - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Met - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Gly - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Nle - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - D-Nal - B'$;

または

$H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Orn - B'$.

本発明の他の特定例においては、原子団 B' を hPTH または bPTH または pPTH、もしくはそれらの $Z = -COOH$ または $-COO^- + M$ またはアミド誘導体の 7 ~ 3 4 活性単位の残りのペプチドあるいは hPTH、bPTH、pPTH または hPTH rP の残りの 7 ~ 8 4 配列の残留物から選択する次のものを含む。

$H_2N - Ser - Val - Phe - Glu - Ile - Phe - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Phe - Glu - Ile - Ser - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Tyr - Glu - Ile - Phe - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Tyr - Glu - Ile - Ser - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Phe - Glu - Ile - Ala - B'$;

$H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - His - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Val - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Leu - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Ile - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Pro - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Phe - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Trp - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Met - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Gly - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Nle - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - D-Nal - B'$;

または

$H_2N - Ser - Val - Ser - Glu - Ile - Orn - B'$.

本発明の他の特定例は原子団 B' を hPTH または pPTH もしくはそれらの $Z = -COOH$ または $-COO^- + M$ またはアミド誘導体の 7 ~ 3 4 活性単位の残りのペプチドあるいは hPTH、bPTH、pPTH、または hPTH rP の残りの 7 ~ 8 4 配列の残留物から選択する次のものを含む。次の類似体の表では 1 位のアミノ酸はアラニンであり 3 位はセリン、さらに 6 位は種々のアミノ酸である。

$H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Ala - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Thr - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Cys - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Tyr - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Asp - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Glu - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Ser - Glu - Ile - Asn - B'$;

$H_2N - Ser - Val - Lys - Glu - Ile - Ala - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - His - Glu - Ile - Ala - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Leu - Glu - Ile - Ala - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - His - Glu - Ile - Glu - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Leu - Glu - Ile - Glu - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Lys - Glu - Ile - Glu - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Phe - Glu - Ile - Glu - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Nle - Glu - Ile - Glu - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - D-Nal - Glu - Ile - Glu - B'$;
 $H_2N - Ser - Val - Orn - Glu - Ile - Glu - B'$;

$H_2N - Ala - Val - Phe - Glu - Ile - Phe - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Phe - Glu - Ile - Ser - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Tyr - Glu - Ile - Phe - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Tyr - Glu - Ile - Ser - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Phe - Glu - Ile - Ala - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Lys - Glu - Ile - Ala - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - His - Glu - Ile - Ala - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Leu - Glu - Ile - Ala - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - His - Glu - Ile - Glu - B'$;
 $H_2N - Ala - Val - Leu - Glu - Ile - Glu - B'$;

または

$H_2N - Ala - Val - Leu - Glu - Ile - Glu - B'$.

hPTH のそれらの活性 1 ~ 3 4 アミノ酸配列は、特に $Z = -COOH$ または $-COO^- + M$ または $- (C=O) - NH_2$ の末尾をなすそれらのアミノ酸配列が好ましい。

次表の類似体では、1 位のアミノ酸はセリンであり、3 位の

アミノ酸は変化するもので、8位のアミノ酸も変化した、9位のアミノ酸はヒスチジンである。原子団D'はhPTH、またはbPTHまたはpPTH、もしくはZ-COOHまたは-COO-Mまたは-(C=O)-NH₂、誘導体の10~34活性単位の残りのアミノ酸あるいはhPTH、bPTH、pPTH、またはhPTHrPの残りの10~84アミノ酸の残留物から選択する。

H₂N-Ser-Val-Phe-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-D' ;

H₂N-Ser-Val-Phe-Glu-Ile-Ser-Leu-Met-His-D' ;

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Phe-Leu-Met-His-D' ;

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Ser-Leu-Met-His-D' ;

H₂N-Ser-Val-Tyr-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-His-D' ;

H₂N-Ser-Val-Tyr-Glu-Ile-Ser-Leu-Met-His-D' ;

H₂N-Ser-Val-Phe-Glu-Ile-Phe-Leu-Met-His-D' ;

H₂N-Ser-Val-Tyr-Glu-Ile-Phe-Leu-Met-His-D' ; または

H₂N-Ser-Val-Phe-Glu-Ile-Nle-Leu-Met-His-D' ;

次表の類似体で1位のアミノ酸はセリンで、B*はセリンでありJはグルタミンで9位のアミノ酸Xしか異なっていない。

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Leu-D' ;

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Phe-D' ;

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Tyr-D' ;

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Glu-D' ;

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Lys-D' ;

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Gln-D' ;

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Nle-D' ; または

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-D-Nal-D' ;

次表の類似体では、1位のアミノ酸はアラニンであり、Xはフェニルアラニンで8位および9位のアミノ酸(B, J)が異なるにすぎない。D'は上記のものである。

H₂N-Ala-Val-Phe-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-His-D' ;

H₂N-Ala-Val-Phe-Glu-Ile-Ser-Phe-Met-His-D' ;

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Phe-Phe-Met-His-D' ;

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Ser-Phe-Met-His-D' ;

D'は上記のものである。

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Ala-D' ;

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Ser-D' ;

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Leu-D' ;

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Phe-D' ;

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Tyr-D' ;

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Glu-D' ;

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Lys-D' ;

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Gln-D' ; または

H₂N-Ser-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Leu-Met-Nle-D' ;

次表のアミノ酸類似体では、1位のアミノ酸はアラニンで、3位のアミノ酸はセリンで、8位のアミノ酸Jはグルタミンであり、9位のアミノ酸Xが異なるにすぎない。D'は上記のものである。

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Ala-D' ;

H₂N-Ala-Val-Ser-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-Ser-D' ;

H₂N-Ala-Val-Tyr-Glu-Ile-Gln-Phe-Met-His-D' ;

H₂N-Ala-Val-Tyr-Glu-Ile-Ser-Phe-Met-His-D' ;

H₂N-Ala-Val-Phe-Glu-Ile-Phe-Phe-Met-His-D' ;

H₂N-Ala-Val-Tyr-Glu-Ile-Phe-Phe-Met-His-D' ;

H₂N-Ala-Val-Nle-Glu-Ile-Phe-Phe-Met-His-D' ; または

H₂N-Ala-Val-D-Nal-Glu-Ile-Phe-Phe-Met-Phe-D' ;

ポリペプチド合成の詳細な説明

本発明に係るポリペプチドはこの技術で知られている合成技術により調製される。米国特許第4,318,905および3,531,258号の技術は、特にここに参考として記載する。本発明の重要な特徴は生物学的に活性な合成ポリペプチドの調製であり、少なくとも3のアミノ酸B、または6のアミノ酸、あるいは9のアミノ酸X、もしくはそれらの組合わせを天然の、変わったまたは天然の合成のアミノ酸類似体で置換することである。

本発明のポリペプチドは当業者知られている任意の技術により合成することができる。極めて有効な多くの技術の優れた摘要書はJ.M. Stewart および J.D. Young、"Solid Phase Peptide Synthesis"、第2版、Pierre Chem.社、米国イリノイ州、ロックフォード、(1969)ならびに固相ペプチド合成のためのJ. Meinshofer、"Hormonal Proteins and Peptides"、

Vol. 2, p. 46, Academic Press (ニューヨーク)、1973、さらに通常の縮合合成のための E. Schroder および K. Lubke, 「The Peptides」、Vol. 1, Academic Press (ニューヨーク)、1965 に見出すことができる。

一般に、これらの方法は 1 種または 2 種以上のアミノ酸あるいは適当に保護したアミノ酸を成長するペプチド鎖に連続添加することを含む。通常、第一アミノ酸のアミノ基またはカルボキシル基を適当な保護基により保護する。次いで保護したかまたは誘導したアミノ酸はどちらもアミド結合を形成させるために適当な条件下で不活性固形支持体に結合させるか適当に保護されたコンプリメンタリー (complimentary) (アミノまたはカルボキシル) 基を有する次のアミノ酸を連続して添加することにより溶液中で用いることができる。次いでこの新しく添加したアミノ酸残基から保護基を除去し次いで次のアミノ酸 (適当に保護した) を添加したりする。すべての所望のアミノ酸を適当な配列で結合させた後、順次にまたは同時に任意の残りの保護基 (および任意の固形支持体) を除去して、最終的なポリペプチドを生成する。この一般的方法を簡単に改良して、成長する鎖に一種以上のアミノ酸を同時に添加することができ、例えば保護したトリペプチドを適当に保護したジペプチドと結合させ (キラル中心をラセミ化しない条件下) 保護基を除去した後、ペンタペプチドを形成することができる。

本発明に係る化合物を調製する特に好ましい方法は固相ペプチド合成を含む。

この特に好ましい方法では、アミノ酸の α -アミノ官能基を酸または塩基に反応し易い基により保護する。かかる保護基はペプチド結合形成の条件に対して安定であり、一方成長するペ

プチド鎖の破壊またはそこに含まれる任意のキラル中心のラセミ化を起こさずに容易に除去することができるという特徴を有する。適当な保護基は t -ブチルオキシカルボニル (Boc)、ベンジルオキシカルボニル (Cbz)、 p -フェニルイソプロピルオキシカルボニル、 t -アミルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、 α 、 α -ジメチル- β 、5-ジメトキベンジルオキシカルボニル、 o -ニトロフェニルスルフェニル、2-シアノ- t -ブチルオキシカルボニル、 θ -フルオロエニルメチルオキシカルボニル等であり、中でも t -ブチルオキシカルボニル (Boc) である。

特に好ましい鎖端保護基はアルギニンに対してはニトロ、 p -トルエンスルホニル、4-メトキシベンゼンスルホニル、Cbz、Boc およびアダマンチルオキシカルボニルであり；チロシンに対してはベンジル、 o -ブロモベンジルオキシカルボニル、2、 θ -ジクロロベンジル、イソプロピル、シクロヘキシル、シクロペンチルおよびアセチルであり、セリンに対してはベンジルおよびテトラヒドロピラニルであり、ヒスチジンに対してはベンジル、 p -トルエンスルホニルおよび 2、4-ジニトロフェニルである。

C 末端アミノ酸は適当な固形支持体に付着させる。上記合成に対して有用である適当な固形支持体は段階的保護基除去反応の試薬および反応条件に対して不活性であり、用いる媒質中で不溶性であるような材料である。適当な固形支持体はクロロメチルポリスチレン-ジビニルベンゼン重合体、ヒドロキシメチルポリスチレン-ジビニルベンゼン重合体等であり、特にクロロメチルポリスチレン-1%ジビニルベンゼン重合体である。化合物の C 末端がグリシンアミドである特定の場合に、特

に有用な支持体は P. Rivaille 等により「*Helv. Chim. Acta.*, 54 2772 (1971)」に記載されているベンズヒドリルアミノポリスチレン-ジビニルベンゼン重合体である。クロロメチルポリスチレン-ジビニルベンゼン型の樹脂への結合は、 N^{α} 保護アミノ酸、特に Boc アミノ酸 (そのセシウム、テトラメチルアンモニウム、トリエチルアンモニウム、4、5-ジアザビシクロ (5, 4, 0) ウンデカー-5-エン、または同様の塩をエタノール、アセトニトリル、 N 、 N -ジメチルホルムアミド (DMF) 等の中で、特に DMF 中のセシウム塩として)、高い温度例えば $40^{\circ}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは約 50°C で、約 12~48 時間、好ましくは約 24 時間、クロロメチル樹脂と反応させることにより行う。 N^{α} -Boc-アミノ酸は N 、 N' -ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) / 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HBT) 媒介カップリングを約 2~24 時間、好ましくは約 12 時間、約 $10^{\circ}\sim 50^{\circ}\text{C}$ の温度、好ましくは 25°C で、ジクロロメタンまたは DMF のような溶媒、好ましくはジクロロメタン中で行うことによりベンズヒドリルアミン樹脂に結合する。連続して保護したアミノ酸の結合は業界で良く知られているような自動ポリペプチド合成装置で行うことができる。 N^{α} 保護基の除去は、例えばトリフルオロ酢酸を、塩化メチレンに溶解した溶液、塩化水素をジオキサンに溶解した溶液、塩化水素を酢酸に溶解した溶液、または他の強酸溶液の存在下で、好ましくは 50% トリフルオロ酢酸のジクロロメタン溶液の存在下周囲温度で実施することができる。それぞれの保護したアミノ酸は約 2.5 モル過剰に導入するのが好ましくカップリングはジクロロメタン、ジクロロメタン/DMF 混合物、DMF 等、特に塩化メチレン中、周囲温度で実施

することができる。カップリング剤は通常 DCC のジクロロメタン溶液であるが、 N 、 N' -ジイソプロピルカルボジイミドまたは他のカルボジイミド単独もしくは HBT、 N -ヒドロキシスクシンイミド、他の N -ヒドロキシイミドあるいはオキシムの存在下でもよい。他の保護したアミノ酸活性エステル (例えば p -ニトロフェニル、ペンタフルオロフェニル等) または対称無水物を用いることができる。

固相合成の終わりに、十分に保護したポリペプチドをベンジルエステル型の樹脂製支持体から除去し、開裂 (cleavage) は $10^{\circ}\sim 50^{\circ}\text{C}$ 、好ましくは約 25°C の温度で、約 12~24 時間、好ましくは約 18 時間、ブロリン C 末端を有するペプチドに対してはアルキルアミンまたはフルオロアルキルアミンを用いてアミノリシスするか、或いはグリシン C 末端を有するペプチドに対しては例えばアンモニウム/メタノールまたはアンモニウム/エタノールを用いてアミノリシスすることによる。あるいはまた、ペプチドは例えばメタノールを用いたエステル交換、次いでアミノリシスにより樹脂から除去することができる。保護したペプチドはこの時点で HPLC またはシリカゲルクロマトグラフィーにより精製することができる。

特定のペプチド合成および精製の工程は次の実施例で記載し、表 2、3 および 4 に要約する。

有用性

本発明の酸性ペプチド類似体、すなわち 3、6 または 9 位で酸性したかまたは 3、6 または 9 位の置換を組合わせて酸性アミノ酸を有するような PTH 等の類似体は特にヒトにおいて、副甲状腺ホルモンに関連する医学的疾患または病気の治療のためのアゴニストまたはアンタゴニストとして有用である。これ

らの病気等はここに記載されている。

投与

これらの化合物および組成物を投与するための正確な量および組成は治療を受ける個々の被験者の要求、治療の形式、痛の程度または必要度および、もちろん開業医の判断により必然的に決まる。一般に、経口投与は一層吸収に依存する他の投与方法よりも低い投与量が要求される。しかし、特定の薬剤、例えばジメチルスルホキシドは皮膚を通してポリペプチド化合物の移動を促進するようである。

組成物

本発明の他の面は活性成分として、本発明に係る化合物を含む医薬組成物に関し、この医薬組成物は医薬として受け入れることができる無毒性担体（賦形剤）と混合して本発明に係る化合物を含む。上述したように、かかる組成物は経口（皮下、筋肉内または静脈内）投与用に使用するために特に液体溶液または懸濁液の形態で調製することができ、腫または直腸投与での使用には特にクリームおよび坐剤のような半固体の形態で；経口または口内投与には特に錠剤またはカプセルの形態で、もしくは鼻腔内には特に散剤、鼻の滴剤またはエロゾルの形態で調製することができる。

組成物は単位投与量の形態で都合よく投与することができ製薬業界でよく知られている任意の方法、例えばRemingtonの「Pharmaceutical Sciences」米国ペンシルベニア州イーストンのMack Publishing Company, 1970に記載されているような方法により調製することができる。経口投与のための組成物は普通の賦形剤として澱粉水または生理的食塩水、ポリエチレングリコールのようなポリアルキレングリコール、野菜由来の

油、水素添加したナフタレン等を含有することができる。腫または直腸投与のための組成物、例えば座剤は賦形剤として、例えばポリアルキレングリコール、ワセリン、ココア乳脂等を含有することができる。吸入投与のための組成物は固体で、賦形剤として例えばラクトースを含むかあるいは鼻の滴剤の形態で投与するために水性または油性溶液である場合がある。口内投与のためには、賦形剤には糖、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、プレゲリナチンド(pregelinated)澱粉、等が含まれる。

しばしば本発明に係る化合物を長期間、例えば1回投与から1週間～1年の間被験者に与えることが望ましい。種々の徐放型投与形態、貯蔵型投与形態または移植投与形態を用いることができる。例えば、投与形態は体液中で溶解度の低い、例えば、(a) リン酸、硫酸、クエン酸、酒石酸、タンニン酸、パモイック酸(pamoic acid)、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンモノーまたはジスルホン酸、ポリガラクトロン酸等のような多塩基酸との酸付加塩；(b) 亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウム等、の多価金属カチオンを用いた、あるいは例えばN, N'-ジベンジルエチレンジアミンまたはエチレンジアミンから形成した有機カチオンを用いた塩；もしくは(c) 例えばタンニン酸亜鉛塩のような(a) および(b)の組合わせのような化合物の医薬として許容し得る無毒性塩が含まれる。さらに、本発明に係る化合物、好ましくは、前述のような比較的不溶性の塩を注射液に適当なゲル中、例えばゴマ油とのモノステアリン酸ゲルに配合することができる。特に好ましい塩は亜鉛塩、タンニン酸亜鉛塩、パモエート(pamoate)塩

等である。カプセル封入するために、注射するための他の形態の徐放型貯蔵組成物は、ポリ乳酸/ポリグリコール酸重合体のような徐々に分解する無毒性の、抗原性のない重合体で、例えば米国特許第3,773,919号に記載されているような重合体中に分散させた化合物または塩を含む。また化合物または上述したような比較的不溶性の塩は特に動物に使用するためにコレステロール基材シラスティック小球中に配合することができる。さらに徐放型組成物、貯蔵型組成物または移植組成物、例えばリポソームは文献でよく知られている。例えば、「Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems」, J.R. Robinson 編, Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク, 1978参照。

次の実施例は説明および例示のために与えるにすぎない。いづれにしてもこれら例に制限されるものではない。

材料—合成ウシPTH(1~34)を米国カリフォルニア州、トランスのBachem, Inc. から得た。合成ヒトPTHrP(1~34)アミドを米国ペンシルベニア州、ウエストポイントのMerck Sharp and Dohme から得た。合成ウシ「Tyr³⁴」PTH(7~34)アミドおよび「Tyr³⁴」PTH(7~34)アミドを米国カリフォルニア州、ベルモントのPeninsula Laboratories, Inc. から得た。これらのペプチドの純度はHPLCにより95%を上回っていた。適当なペプチド組成物はアミノ酸の定量分析により確かめた。

CD分光分析法。遠紫外線円二色性(CD)スペクトルを(+)10-カンファースルホン酸およびエピアンドステロン(epiandrosteron)で調整したInstruments SA Jobin Yvon 円二色計で1.0 mmセルで25±1℃のリン酸緩衝液(pH7.0)

中で得た。ペプチドを0.1~0.3 mg/mlの濃度範囲で分析した。222 nmの残基当たり平均モル楕円率([Q] 222 nm⁻¹ · deg · cm² / dmol)を用いて Taylor および Kaiserの方法(参考文献28)によりα-らせん性の評価を得た。

ペプチド合成および精製—ペプチド合成を米国カリフォルニア州、フォスターシティのApplied Biosystems Model 430A Peptide Synthesizer を用いて実施した。t-Boc-Phe-OCH₂-Pam樹脂を固形支持体として用い、次のt-Boc(タートブチロキシカルボニル)アミノ酸誘導体: Arg(Toc), Asp(OBzl), Glu(OBzl), His(DNP), His(Z), Lys(CI-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO)、およびTyr(Br-Z)を用いた。カップリングサイクルを含む標準プログラム(予め形成した対称無水物および予め形成したHOBtエステル)を用いた。ペプチドの一般的な合成は例えば特にここにそのまま参考として記載した米国特許第4,318,905号に見い出される。

本発明を次の実施例により説明する。本発明は、これ等の実施例により制限されるものではない。

合成における変更を以下に記載し、表2、3および4に要約する。

実施例1

ペプチド調製

標準t-Bocサイクルは活性化、溶液交換、およびカップリング処理のために存在し；それぞれACT、CONCおよびRVサイクルと称する。標準t-Boc静的実験ファイル中の

一組のベッセル (vessel) サイクル割り当てを応用バイオシステムで実施する試験および合成の最適化に基づき各アミノ酸のために選定した。

静的実験において割り当てたサイクルの記述は「アクチベーターサイクル (ACT)」、「コンセントレーターサイクル (CONC)」および「リアクションベッセルサイクル (RV)」の下に後に記載する。合成のための他のベッセルサイクルも含まれる。

Arg, Asn, および Gln を除いてすべてのアミノ酸を DCM 中の 0.5 M DCC の 1 ミリモルを用いて対称無水物に活性化した。この反応の副産物、DCU はほとんど直ちに沈殿しはじめた。各サイクルのために当てたすべての活性化時間は 8 分であった。これら 8 分のうち 4 分は溶液から過剰の DCM をパーキングし、約 2 ml の DCM を除去するためのものであった。また、パーキングは DCU 沈殿を補助する溶液を冷却した。

活性化が完了した際にアミノ酸溶液を ACT から CONC に移し換えた。移動管の完全な洗浄を先に行い次にベッセル間の各移動を行った。この方法は移動の前後で管をきれいにし、サイクル間にアミノ酸を持ち越す可能性を排除した。

aboc 4 サイクル用に活性化アミノ酸溶液を CONC に移し変える時間は aboc 1、aboc 2 または aboc 3 のためのものより長く、この場合も aboc 4 ACT サイクル中に取り扱われる一層大きな溶液体積のためである。ACT の 2 度の DCM 洗浄液をすべての単一カップリングサイクルにおける CONC に移し換えた。表 2 に記載する時間は初期の活性化時間およびパーキング時間を含む。

表 2

サイクル名	単一カップリング 選定したアミノ酸	アクチベーター 溶解液量 (約)	サイクル 溶解時間 (分) (約)	移し換え時間 (秒)
aboc 1	Ala, Asp(OBzl), Cys(4-Me-Bzl), Cys(9-MeBzl), Glu(OBzl), Gly, Ile, Met, Phe, Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(Br-Z), Val	3 ml の DCM	2	1=30 2=23
aboc 2	Lys(Cl-Z), Pro His(Tos)-乾燥	3 ml の DCM	8	1=35 2=23
aboc 3	Leu, Met(O), Trp, Trp(CH ₃)	0.3 ml の DMF 2.5 ml の DCM (2 つの個々の DCM 溶解液)	7	1=30 2=23
aboc 4 **	His(Tos)	7 ml DCM 中で 予め溶解した	0	1=40

* 1=アミノ酸カートリッジからアクチベーターに移し換える

2=アクチベーターからコンセントレーターに移し換える

** aboc 4 はイオン交換処理の完了後に His(Tos)DCHA に用いる

表 3

サイクル名	アミノ酸	溶解液量	溶解時間	活性化した 溶解液	活性化時間
aboc 1d	Asn, Gln	4.0 ml の HOBt 0.3 ml の DCM	6.5 分	HOBt エステル	33 分
aboc 2d	Arg(Tos)	4.0 ml の HOBt 1.5 ml の DCM	8 分	HOBt エステル	33 分
aboc 3d	Arg(MTS)	4.0 ml の HOBt 1.5 ml の DCM	8 分	HOBt エステル	48 分
aboc 4d**	His(Tos)	7 ml の DCM 中に 予め溶解した	0 分	対称無水物	8 分

** aboc 4d はイオン交換処理の完了後にダブルカップル His(Tos)DCHA に用いる

活性化およびパーキングの終りに、アミノ酸溶液を CONC に移し換える準備をした。移動ラインの完全な洗浄を先に行い次にベッセル間の各移動を行った。この方法により移動の前後で管を浄化してサイクル間の持ち越しの可能性を排除した。活性化したアミノ酸溶液を ACT の 1 回のその後の DCM 洗浄液と一緒に CONC に移し換えた。

HOBt-エステル活性化サイクルは対称無水物サイクルの 2 倍量の DCU を生じ、従って、移動後に一層広範な洗浄処理が要求された。この洗浄は 2 回の 50:50 DCM:MeOH 洗浄次いで 3 回の DCM 洗浄からなる。第 1 DCM:MeOH 洗浄はほとんどベッセルを満たし、パーキング中にベッセルの上端に運ばれたすべての DCU をこの洗浄で溶解した。第 2 DCM:MeOH 溶液はフリットに付着した DCU の除去を確実にした。残留する MeOH をその後 3 回の DCM 洗浄で洗い落とした。

表 4

サイクル名	アミノ酸	全時間	パージング 時間	DMF 添加 (約)	ヒーター設定/使用
単一カップリング:					
cboc 1	Ala	13 分	4 分 5 分 4 分	2 mL 2 mL	15°C/第1 DMF 放出 後につけた
cboc 2	Asp(OBzl), Cys(4me-Bzl), Gln(OBzl), Ile, Met, Met(O), Phe, Pro, Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp **, Val	10 分	10 分 6 分	2 mL 2 mL	15°C/第1 DMF Cys (p-MeBzl), 放出後 につけた
cboc 3	Leu Trp(CBO) **	14 分	10 分 4 分*	1 mL 3 mL	5°C/第1 DMF 放出 後につけた
cboc 4	Lys(Cl-Z) Tyr(Br-Z)	8 分	5 分* 1 分*	1 mL 3 mL	15°C/直ちにつけた
cboc 5	Gly, His(Tos)	6.5 分 0.5 分	---	1 mL	10°C/直ちにつけた
ダブルカップリング:					
cboc 1d	Arg(Tos) Arg(MTS) ASN, Gln	0 分	0 分	---	10°C/ヒーターは使 用せず
cboc 2d	His(Tos)	6.5 分	6 分 0.5 分	1 mL ----	10°C/ヒーターは使 用せず
リカップリング:					
c recpl	すべて単一 カップリング したアミノ酸	0 分	0 分	----	10°C/ヒーターは使 用せず

* 多数の短いパージング

** ヒーター温度設定は25°Cである

同一のサイクルである。

実施例 3単一カップリングサイクル—rboc 1, 2, 1r, 2r, 1rr, 2rr

すべての単一カップリングRVサイクルは次の型に適合させる:

1. 33% TFA の DCM 溶液で 80 秒間
2. 50 " 18.5 分間
3. 3 回の DCM 洗浄
4. 10% DIEA の DMF 溶液で 1 分間
5. "
6. 5 回の DMF 洗浄
7. カップリング期間
8. 5 回の DCM 洗浄

2 種の単一カップリングRVサイクルがあり、これらはカップリング期間の長さ、すなわち保護基を取り除いた樹脂結合ペプチドが活性化したアミノ酸と共に溶液状態である場合の時間が変わるにすぎない。この期間は「受け取る用意をした」段階で始まりRVからアミノ酸溶液を排出する場合に終る。rboc 1 サイクルおよびその関連する樹脂サンプリングサイクル、rboc 1r。

5 回の広範な DMF 洗浄はカップリング前に樹脂 RV、および関連するラインから DIEA の完全な除去を確実にする。これにより RV は容易にカップリング溶液を CONC から受け取る用意ができ、結果としてカップリング期間をあとに続けることができる。

カップリング期間に次いで直ちにカップリングしてないアミ

Cリカップリングサイクルは標準的には存在するが、標準 1-Boc 実験には割り当てられなかった。このサイクルは簡単にカップリング溶液として DCM を用いて任意のアミノ酸をリカップリングするために適定された移動サイクルである。このサイクルは初期の溶液 DCM が異なるカップリング溶液 DMF と交換されないでパージングまたはヒーターの使用が含まれない。アミノ酸溶液をさらに CONC の 2 回の DCM 洗浄と一緒に RV に移し換える。

c recpl サイクルは通常の単一カップリング ACT サイクルおよび recpl 2 または recpl 2r のどちらでも、DCM RV リカップリングしたサイクルと共に用いる必要がある。

実施例 2**リアクションベッセル (RV) サイクル**

RV サイクルには 2 つの形式があり、樹脂試料を用いるものと用いないものである。樹脂サンプリングサイクルは下側 RV 弁ブロックアップ(block up)から隔壁フィッティング(fitting)を通り RV に至るサンプリングラインを数回洗浄した。この洗浄はライン中の樹脂、TFA、またはカップリング溶液の蓄積を防止する。

樹脂サンプリングサイクルは、サイクル名の末尾に「r」を有する(すなわち、rboc 1r)。サイクル名が末尾に「r」を有する場合(すなわち、rboc 1rr)には、カップリング後に 2 つの樹脂試料を用いている。「rr」サイクルは設置するためにこのディスク上に含まれる。同一の数字を有する RV サイクル、例えば rboc 1 および rboc 1r は、後者のサイクルで樹脂サンプラーを用いることを除き、

ノ酸および DMF を洗浄除去するために 5 回の DCM 洗浄を行う。第 2 の機能として、これらの洗浄はサンプリング溶液を提供する。1 種の樹脂試料を用いた場合、少なくとも洗浄は試料のための媒質を提供する。ダブル樹脂サンプリングサイクル(すなわち、「rr」サイクル)は第 3 および第 4 洗浄を用いて 2 種の樹脂試料を集める。

実施例 4ダブルカップリングサイクル—rboc 1d, 2d, 1dr, 1dr

すべてのダブルカップリングRVサイクルは次の型を用いる:

1. 33% TFA の DCM 溶液で 80 秒間
 2. 50 " 18.5 分間
 3. 3 回の DCM 洗浄
 4. 10% DIEA の DMF 溶液で 1 分間
 5. "
 6. 5 回の DMF 洗浄
 7. カップリング期間
 8. 3 回の DCM 洗浄
 9. 10% DIEA の DMF 溶液で 45 秒間
 10. 1 回の DMF 洗浄
 11. 3 回の DCM 洗浄
- 最初の半分の終点 —
12. 第 2 カップリング期間
 13. 1 回の DMF 洗浄
 14. 5 回の DCM 洗浄

最初の半分のダブルカップリングサイクルは単一カップリングサイクルと同様である。上記表の最初の 8 つの処理は単一カ

カップリングRVサイクル中の同等の処理と全く同じである。しかし、ダブルカップリングサイクルのためには、一層長い全カップリング時間が必要である。rboc 1dおよびrboc 1drサイクルはそれぞれ42分(第一)カップリング期間を有し;rboc 2dおよびrboc 2drサイクルはそれぞれ26分(第一)カップリング期間を有する。

他の違いは洗浄中にカップリング相に次いで直ちに表われる。8回のDMF洗浄はすべての余分のアミノ酸を除去し次いで樹脂を一以上の塩基で処理する。

ペプチド樹脂はチオフェノールのジメチルホルムアミド溶液中で処理してヒスチジン残基を脱ブロックする(参考文献30)。

実施例5

ペプチド樹脂からのヒスチジンのDNP基の脱保護

リアクションベッセル中のペプチド樹脂は樹脂をスラリーにするのに必要な最少量の精製したDMFに懸濁させた(1g樹脂当たり約5mL)。各1モルDnpヒスチジンの存在に対し20モルのチオフェノール(0.102mL/mmole)を添加した。ベッセルを周囲温度で1時間振とうした。チオリシスは迅速であり恐らく15分で完了した。DMF、水、EtOH、およびDCMで樹脂を完全に洗浄しペプチド樹脂を乾燥させた。次いでペプチド樹脂を通常の方法で開裂させた。普通少量の著しく黄色いDnp-チオフェノールは樹脂に吸収され開裂後にこれをペプチドで抽出した。Dnp-チオフェノールは標準精製処理でペプチドから容易に除去された。

実施例6

脱保護および開裂

ペプチドをHF:アニソール:DMS(10:1:1)と

-5~0℃で8分間接触させた。

N末端t-Boc保護基を除去した後、ペプチドのブロックをはずして無水フッ化水素を用いて樹脂から開裂させた。

実施例7

抽出処理

ペプチド樹脂をHF中-5~0℃で50分間反応させた後、HFを窒素流によって10~15分以内に簡単に蒸発させた。この処理中副反応を防止するために、リアクションベッセルを-5℃~0℃に保つことが重要であった。HFを除去した後、エーテルをリアクションベッセルに添加してペプチド-樹脂-スカベンジャー混合物を約30秒間かき混ぜた。次いでエーテル溶液をガラス漏斗を介して濾過した。2回以上繰返すことで、このエーテル洗浄はほとんどのスカベンジャーを除去した。

ペプチドは30%酢酸中で混合物をかき混ぜることによりペプチド-樹脂混合物から抽出した。30%酢酸中で溶けないこれらのペプチドに対しては、一層高い濃度の酢酸が推奨される。代表的に、1gのペプチド樹脂に対して約30mLの30%酢酸を用いた。酢酸抽出物をエーテル抽出で用いた同様のガラス漏斗を介して異なる濾過用フラスコ中に濾過した。ペプチドの完全な抽出を確実にするために、約30mLの10%酢酸を用いて抽出処理を繰返した(2回)。酢酸溶液を凍結乾燥する前に水で希釈した。一層薄い酢酸溶液は凍結したままであるが、濃厚な酢酸水溶液は凍結乾燥中に融解する場合がある。

次いでこの溶液を凍結乾燥して粗ペプチドを得た。

セリンを含んでいるペプチドには、HF開裂中にN-Oシフトが発生する場合がある。残留しているホルミル基は1Mエタノールアミンの6Mグアニジン-HCl溶液を用いて0℃で5

分間処理することにより除去した。

実施例8

ペプチドの脱ホルミル化

トリプトファンのホルミル(CHO)保護基はHF-トリフルオロメタンスルホン酸安定種である。合成されたペプチドのTRP(CHO)による脱ホルミル化は強酸開裂後に別々の工程を必要とする。Trp(CHO)の脱ホルミル化は最も熟練した場合でさえ問題が生じることがあるので以下の処理に厳密に従う必要がある。

1. Trp(CHO)含有ペプチドを6MグアニジンHCl中に溶解して濃度1~10mg/mLとする。

2. 溶解したペプチドに対しUVスペクトル分析を行う。Trp(CHO)含有ペプチドに対しては、300nmの吸光度の方が280nmの吸光度より大きい。

3. ペプチド-グアニジン溶液を氷浴で冷却する。電磁かき混ぜ機を用いて、溶液を0℃になるまでかき混ぜる。

4. 最終濃度1Mを生ずるのに十分なエタノールアミンをペプチドグアニジン溶液に添加する(1mLエタノールアミン/16.6mLペプチドグアニジンはエタノールアミン中で1M溶液を生ずる)。エタノールアミンを添加した後、この溶液のpHは10~11の間である。

5. 0℃で5分間かき混ぜ次いで濃HClをpH7に至るまで添加することにより冷却する。

6. このペプチドにつきUVスペクトル分析を行ってトリプトファンの完全な脱ホルミル化を確実にする。保護されていないTrp含有ペプチドに対しては280nmの吸光度の方が300nmの吸光度より大きい。

7. このペプチドをゲル濾過カラムで脱塩するかあるいはグアニジンおよびエタノールアミンを除くために透析することができる。あるいはまた、この溶液を精製するために調製用高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)システムにかける。

8. 予防措置

a. 「試験」脱ホルミル化を1mgのペプチドに対し行う。

b. ペプチドを溶解した後、適当なHPLCシステムのクロマトグラフで分析する。カラム:C-8、緩衝液A:0.1%TFA;緩衝液B:0.1%TFA/60%CH₃CN;グラジエント:45分間で0~100%B。

c. 脱ホルミル化した後、再びクロマトグラフで分析して生成物の完全性を確実にする。脱ホルミル化した生成物はわずかに短い保持時間を有する。

実施例9

脱塩および精製

脱ホルミル化した粗ペプチド調製物を逆相カラム(Delta Pak C₁₈, 300Å)で0.1%トリフルオロ酢酸中のアセトニトリルのグラジエント(0~60%, 24mL/分)を用いて脱塩し次いで20mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.4中でNaClグラジエント(0~0.5M)を用いて抽出したTSK535CMカラム(7.5×150mm)で陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。

最終的な精製はVydacカラム(218TP1022)(0.22×25cm)で0.1%トリフルオロ酢酸中の25~35%アセトニトリルグラジエント、10mL/分の流速を用いて逆相高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)により行った。精製の進行はプラズマ脱着質量分析法および分析用HP

LCを用いて行った。ペプチドの最終的純度は85%より高かった。適当なペプチド組成物はアミノ酸の定量分析により確かめた。

實施例 10

イオン交換HPLC

一般的処理については、M. Carlquist 等の「(1984) J. of Chromatography, Vol. 286, pp. 143 ~ 151」を参照。さらに詳細な処理は以下の様である：

イオン交換HPLCのための装置はLKB2150 HPLCポンプ、LKB2152 HPLCコントローラー、LKB2040グラジエント混合弁、LKB2154 HPLCインジェクターおよびLKB2210レコーダーに連結したLKB2151 HPLC可変波長検出器からなる。分離はLKB UltroPac TSK535 CM陽イオン交換カラム(150×7.5mm直径)で実施した。溶出はリン酸ナトリウム緩衝液、pH8.4 (1.14g水酸化ナトリウムおよび22.5mgの1Mリン酸および水を加えて1000mLの最終体積にした)中の塩化ナトリウムのグラジエント(0~0.3M)を用いて行い、Millipore MF-フィルター(0.22μm)を通して濾過し減圧により脱気した。流速は1mL/分に設定し溶出吸光度を215nmで記録した。2mLの各部分をLKB22112 Redi-Racフラクションコレクターを用いて集めて評価した。構型は逆相HPLCカラムで得た。

实施例 11

PTH/PTHrP受容体結合性およびアデニル酸シクラーゼアッセイ

受容体結合性アッセイは詳細に前述した（参考文献）4.

32) ようにイヌ腎臓膜質膜および UMR 108-H5 ラット骨肉腫細胞において、放射性リガンドとして ^{125}I -標識 PTH (1-34) アミドを用いて実施した。結合能力 (IC_{50}) は放射性リガンドの最大置換の半分のために必要な未標識ペプチドの濃度として定量された。1 μM 以上の未標識 PTH (1-34) の存在下で残留する放射性リガンド結合として定義される非特異的結合はすべての結合価から差し引いた。 ^{125}I -PTHrP (1-34) アミドの特異的：非特異的結合の比は腎臓膜および UMR 108-H5 アッセイにおいて、平均してそれぞれ $>10:1$ および $3:1$ である。アデニル酸シクラーゼ活性はイヌ腎臓膜において、100 μM モル GTP を除いて、ほぼ前述のように $[\alpha-32\text{p}] \text{ATP}$ の ^{32}P サイクリック AMP への転化により評価した (参考文献 33, 34)。UMR 108-H5 細胞中のアデニル酸シクラーゼ活性をほぼ記載した (参考文献 35) ように評価した。簡単に、細胞を ^{3}H アデニンの 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の血清を含まない MEM を用いて 37°C で 2 時間培養して内在性 ATP プールを標識した。次いで細胞を 0.4 mM IBMX に 10 分間さらし、次いで適切なペプチドによりさらに 10 分間周囲強度にさらした。次いで細胞を 20% TCA できれいにし、 ^{3}H サイクリック AMP を Salomon 等のカラム処理 (参考文献 36) により単離した。アデニル酸シクラーゼアッセイにおける能力 (K_a) は最大の酵素活性の半分を生成するペプチドの濃度である。

ここには本発明のわずかな例を示して説明しているが、当業者には種々の変更および変化を3および/または6および/または9位のアミノ酸の置換で行い、本発明の真意および範囲から逸脱することなくアゴニストまたはアンタゴニストの医薬と

しての活性を有するポリペプチド類似体を生成することができることは明らかである。記載した請求の範囲内に入るすべてのかかる変性および変換はこれにより実施される。

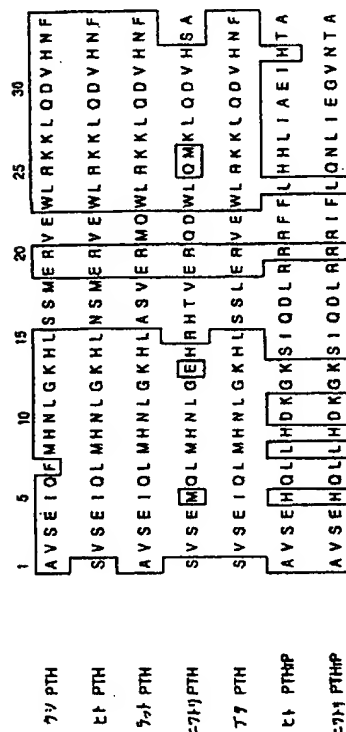


FIG. 1
(促赤核磁)

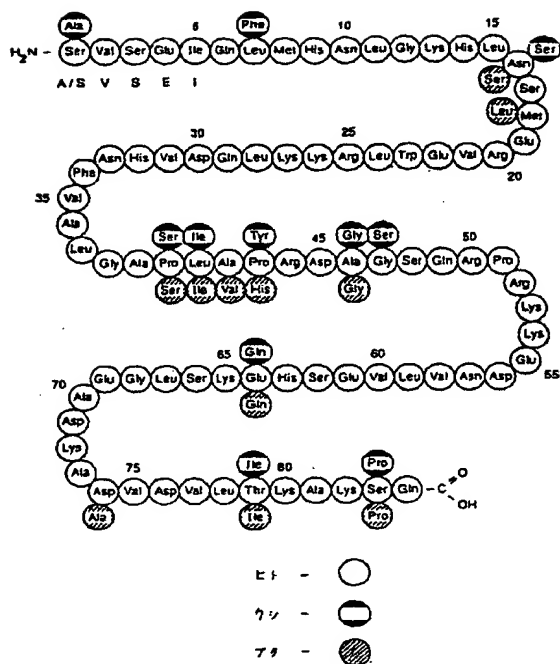


FIG. 1A
(従来技術)

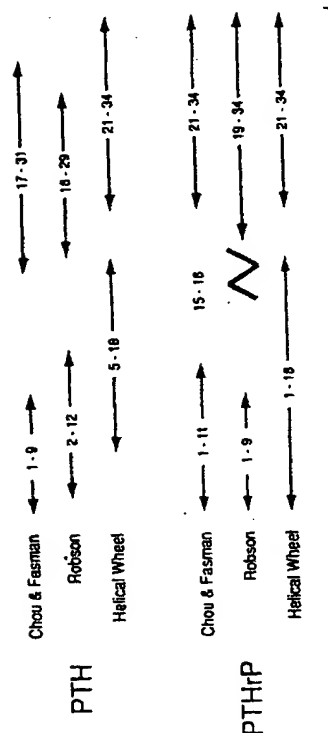


FIG. 3A

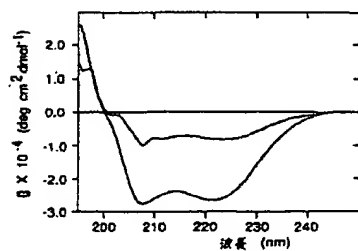


FIG. 3B

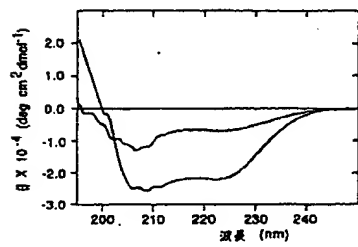


FIG. 3C

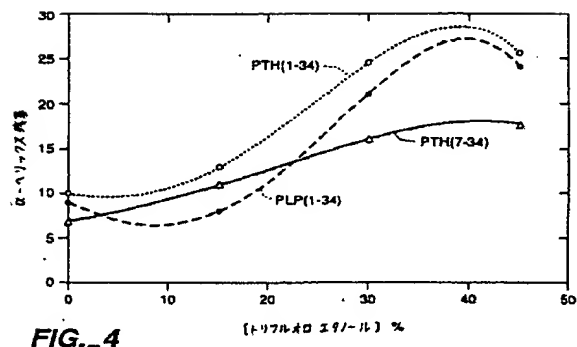
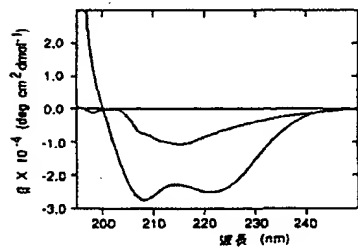


FIG. 4

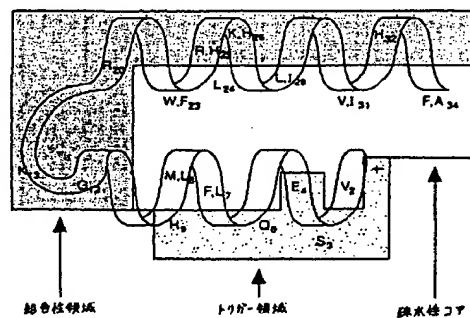


FIG. 5

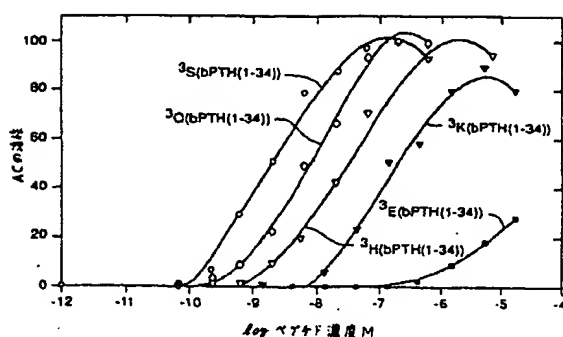


FIG. 6A

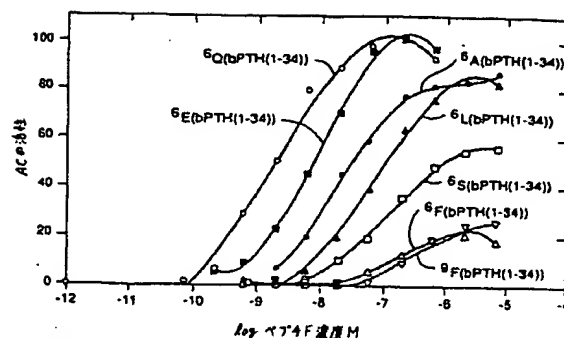


FIG. 6C

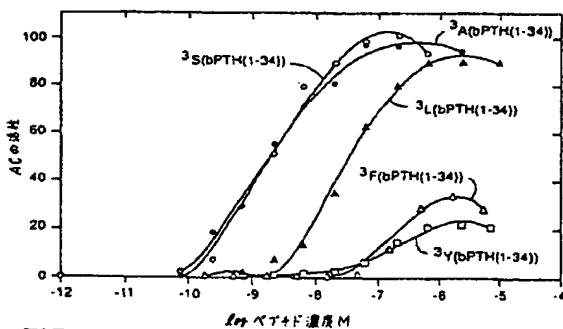


FIG. 6B

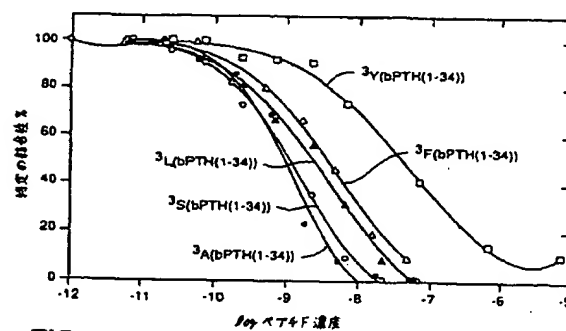


FIG. 6D

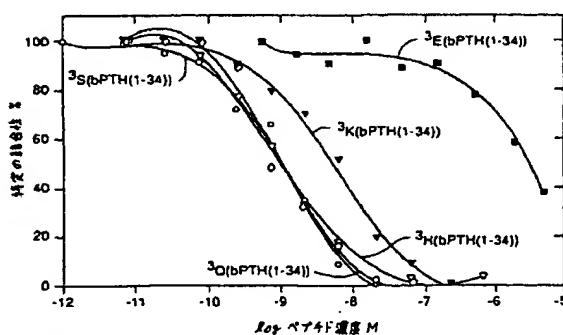


FIG. 6E

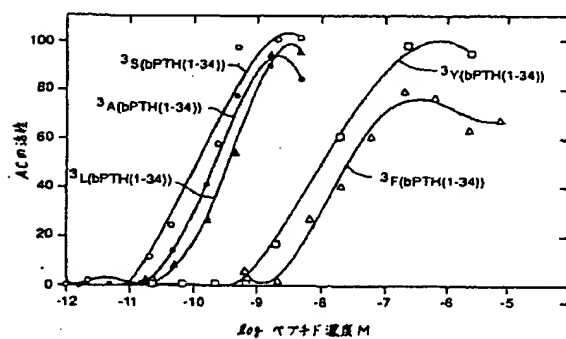


FIG. 7A

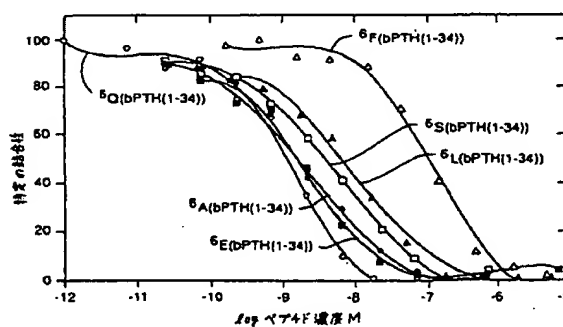


FIG. 6F

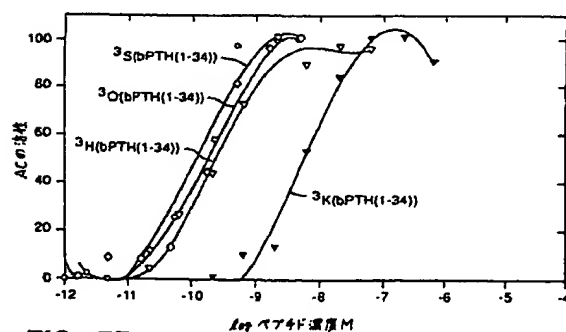


FIG. 7B

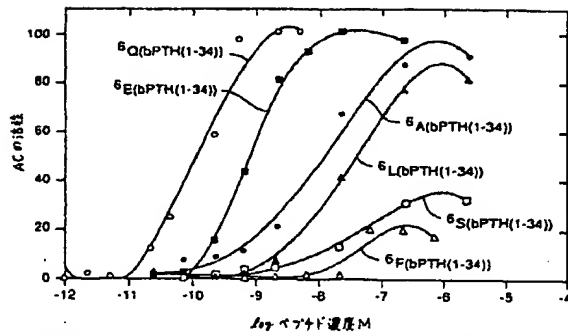


FIG. 7C

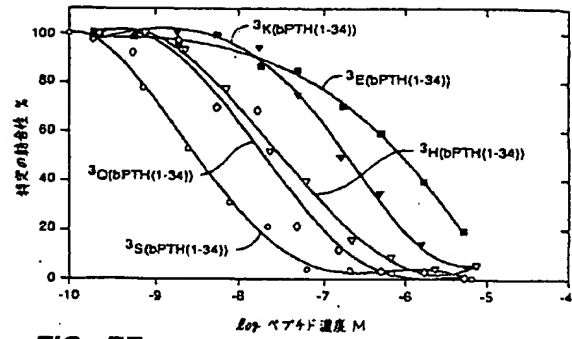


FIG. 7E

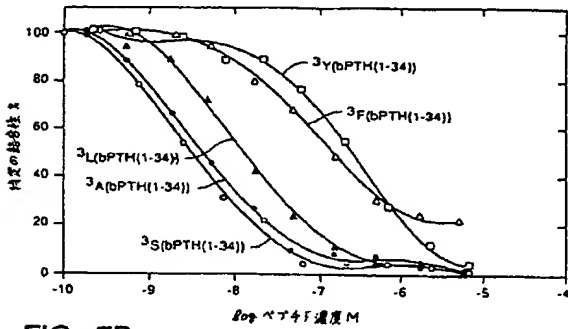


FIG. 7D

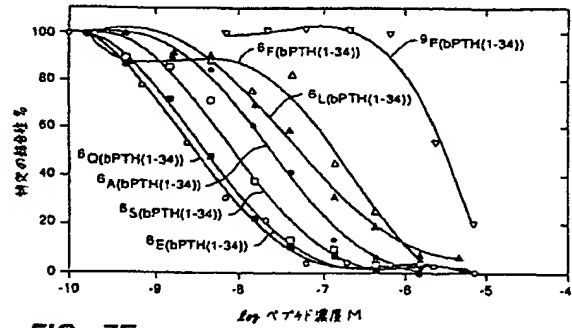


FIG. 7F

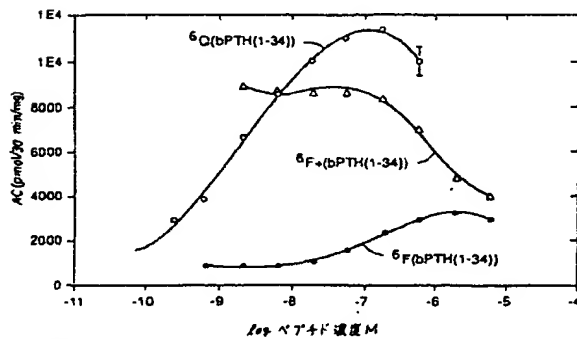


FIG. 8A

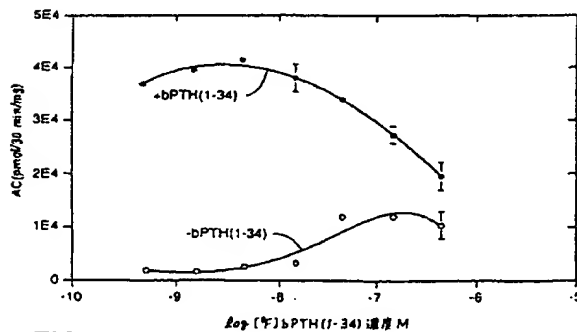


FIG. 8B

要 約

本発明は、副甲状腺ホルモン (PTH)、副甲状腺ホルモン様タンパク質 (PLP) または副甲状腺関連タンパク質 (PTHrP) に対してアゴニストまたはアンタゴニストまたは組織選択特性を有するポリペプチド類似体に関するものである。3位のセリンアミノ酸、8位のグルタミンアミノ酸、9位のヒスチジンアミノ酸またはこれらの組み合わせを、他の天然または合成のアミノ酸によって置換する。好ましくは、約34アミノ酸のヒトPTHフラグメントが高理化学的活性にとって十分である。これらのポリペプチドは、ガン、骨粗鬆症、高カルシウム血症、または副甲状腺機能亢進症の病状状態にあるヒトの治療処置においてアゴニストまたはアンタゴニストとして有用である。また、本発明は変性されたペプチドを用いてあるアッセイを実施し、所定の限界内におさまるアッセイ結果に基づいて、病状状態の治療処置に有用である変性されたペプチドを選択する方法に関するものである。

第1頁の続き

⑨発 明 者	ニツセンソン ロバート エイ	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94010	バーリングゲイム ト ラウスデイル ドライブ 2801
⑩発 明 者	ストリューラー ゴードン ジ エイ	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94111	サンフランシスコ ノエ ストリート 897